

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Funktionale Analysen zur SUMOylierung
des transkriptionellen Repressors L3MBTL2**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christina Stielow
aus Bad Kreuznach

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 15.11.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Prof. Dr. G. Suske
Korreferent:	Prof. Dr. T. Borggreffe

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Die posttranslationale Modifikation mit SUMO	5
2.2 Der Mechanismus der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression am Beispiel des Transkriptionsfaktors Sp3	9
2.3 MBT-Domänen Proteine und ihre Funktion	11
2.3.1 Die Struktur der MBT-Domäne	14
2.3.2 Die Struktur und molekulare Funktion des humanen MBT-Domänen Proteins L3MBTL2	16
2.4 Zielsetzung der Arbeit	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Biologische Sicherheit	19
3.2 Material	19
3.2.1 Antibiotika	19
3.2.2 Bakterienstämme und Kulturmedien	20
3.2.3 Zellkulturlinien und Kulturmedien	20
3.2.3.1 Säugerzelllinien	20
3.2.3.2 Für die vorliegende Arbeit hergestellte, stabil transfizierte Zelllinien	21
3.2.3.3 Zellkulturmedien	21
3.2.4 Plasmide	22
3.2.4.1 Bereits beschriebene Plasmide	22
3.2.4.2 Für die vorliegende Arbeit hergestellte Plasmide	24
3.2.5 Oligonukleotide und Primer	26
3.2.6 Peptide N-terminaler Histonenden für Peptid-Bindungsstudien	28
3.2.7 Rekombinante Proteine und Enzyme	29
3.2.8 Antikörper und Antiseren	29
3.3 Methoden	31
3.3.1 Zellbiologische Methoden	31

3.3.1.1 Umgang mit Säugerzellen.....	31
3.3.1.2 Transfektion von Säugerzellen mit DNA.....	31
3.3.1.3 Transfektion von Säugerzellen mit siRNA.....	32
3.3.1.4 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien aus Einzelzellklonen.....	32
3.3.2 Molekularbiologische Methoden.....	33
3.3.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie.....	33
3.3.2.2 Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	33
3.3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen.....	33
3.3.2.4 Präparation von RNA aus Säugerzellen.....	34
3.3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.3.2.6 PCR-basierte Punktmutation von Aminosäuren.....	36
3.3.2.7 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	37
3.3.2.8 Quantitative PCR (qPCR).....	38
3.3.3 Biochemische Methoden.....	39
3.3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	39
3.3.3.2 Herstellung von Kernextrakten.....	41
3.3.3.3 Proteinbestimmungen.....	42
3.3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
3.3.3.5 Western Blot und Immundetektion immobilisierter Proteine.....	44
3.3.3.6 Nickel-Affinitätschromatographie (Nickel-Pulldown).....	46
3.3.3.7 Expression von 6xHis-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	48
3.3.3.8 Aufreinigung von 6xHis-Fusionsproteinen mittels Ni-NTA-Agarose.....	49
3.3.3.9 <i>In vitro</i> SUMOylierung rekombinanter Proteine.....	50
3.3.3.10 Peptid-Bindungsstudien (Peptid-Pulldown).....	51
3.3.3.11 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP).....	53
3.3.3.12 ChIP-Sequenzierung (ChIP-Seq).....	54
3.3.3.13 Dualer Luziferase-Assay.....	55
3.3.3.14 Microarray.....	56
3.3.3.15 Anti-FLAG Immunpräzipitation von Proteinen aus Kernextrakten.....	57
3.3.3.16 Gelfiltration von Kernextrakten.....	58
3.3.3.17 Ionenaustauschchromatographie von Kernextrakten.....	59
3.3.3.18 Massenspektrometrie.....	61

4. Ergebnisse.....	63
4.1 Identifizierung Sp3-abhängiger Korepressoren als Substrate der SUMOylierung.....	63
4.1.1 Nachweis der SUMOylierung von endogenem Sp3 mit SUMO2/3.....	63
4.1.2 Nickel-Affinitätschromatographie zur Identifizierung SUMOylierter Proteine.....	65
4.1.3 Nachweis der SUMOylierung von endogenem L3MBTL2 mit SUMO2/3.....	70
4.1.4 Identifizierung der SUMO-Akzeptor-Lysine in L3MBTL2.....	73
4.1.5 <i>In vitro</i> SUMOylierung von L3MBTL2.....	79
4.2 Analysen zur Funktion der SUMOylierung von L3MBTL2.....	83
4.2.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens von L3MBTL2 gegenüber N-terminalen Histonenden.....	83
4.2.1.1 Rekombinantes L3MBTL2 bindet an den unmodifizierten N-Terminus von Histon H4.....	83
4.2.1.2 Die SUMOylierung von L3MBTL2 hat keinen Einfluss auf die Bindung an N-terminale Histonenden.....	85
4.2.2 Etablierung von Säugerzelllinien zur stabilen Expression von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2.....	88
4.2.3 Identifizierung der genomweiten Bindungsstellen von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 in Säugerzellen.....	90
4.2.3.1 Validierung der mittels ChIP-Seq identifizierten Bindungsstellen von L3MBTL2.....	97
4.2.4 Untersuchung des Effekts der SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität von L3MBTL2.....	102
4.2.4.1 Die SUMOylierung von L3MBTL2 zeigt keine Auswirkungen auf die Repression eines Reportergens.....	102
4.2.4.2 Genomweite Expressionsanalysen zur Identifizierung durch L3MBTL2 regulierter Gene.....	104
4.2.4.3 Die SUMOylierung von L3MBTL2 führt zur Repression schwach durch L3MBTL2 gebundener Gene.....	106
4.3 Auswirkungen der Konservierung der proteomweiten SUMOylierung auf die Stabilität von Proteinkomplexen.....	110
4.3.1 Unmodifiziertes L3MBTL2 ist in Fraktionen unterschiedlichen	

Inhaltsverzeichnis

Molekulargewichts nachweisbar	110
4.3.2 Stabilisierung hochmolekularer Proteinkomplexe durch die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung.....	112
4.4 Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von SUMOyliertem L3MBTL2.....	115
4.4.1 Untersuchung des Einflusses der SUMOylierung von L3MBTL2 auf die Interaktion mit bekannten Komplexpartnern.....	116
4.4.2 Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Komplexe und Identifizierung assoziierter Proteine durch Massenspektrometrie.....	118
5. Diskussion.....	127
5.1 Identifizierung Sp3-abhängiger Korepressoren als Substrate der SUMOylierung.....	127
5.1.1 Sp3 wird <i>in vivo</i> mit SUMO2/3 modifiziert.....	127
5.1.2 Sp3-abhängige Korepressoren werden selbst mit SUMO modifiziert.....	127
5.2 Analysen zur Funktion der SUMOylierung von L3MBTL2.....	129
5.2.1 L3MBTL2 wird an den Lysinresten 675 und 700 mit SUMO2 modifiziert.....	129
5.2.2 Die SUMOylierung von L3MBTL2 hat keinen Einfluss auf die Bindung an N-terminale Histonenden.....	129
5.2.3 Identifizierung und Analyse der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2.....	131
5.2.4 Welche Faktoren vermitteln die Rekrutierung von L3MBTL2 an Chromatin?.....	133
5.2.5 Untersuchung des Effekts der SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität von L3MBTL2.....	134
5.3 Die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung führt zur Stabilisierung hochmolekularer Proteinkomplexe.....	136
5.4 Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von SUMOyliertem L3MBTL2.....	139
5.5 Ausblick.....	144
6. Literaturverzeichnis.....	147
7. Anhang.....	159

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

L3MBTL2 ist ein Mitglied der Familie von MBT-Domänen Proteinen. MBT-Domänen vermitteln die Bindung an methylierte Lysinreste innerhalb der N-Termini von Histonen. L3MBTL2 wurde als transkriptioneller Repressor beschrieben und ist ein Bestandteil verschiedener Multiproteinkomplexe. In Mäusen besitzt L3MBTL2 eine essentielle Funktion für die Embryonalentwicklung und beeinflusst die Proliferation muriner embryonaler Stammzellen.

In dieser Arbeit wurde L3MBTL2 als Substrat der SUMOylierung identifiziert. Mutationsanalysen zeigten, dass die spezifische Konjugation von SUMO2/3 an den Lysinresten 675 und 700 im äußersten C-Terminus des Proteins erfolgt. *In vitro* SUMOylierungs-Experimente identifizierten PIAS1 als E3 Ligase der L3MBTL2 SUMOylierung. Analysen zur molekularen Funktion der SUMOylierung von L3MBTL2 ergaben, dass die SUMOylierung weder die Bindung des Proteins an N-terminale Histonenden, noch dessen Rekrutierung an Chromatin beeinflusst.

Mithilfe von ChIP-Seq-Experimenten wurden die genomweiten Bindungsstellen von endogenem L3MBTL2, sowie von überexprimiertem wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 identifiziert. Endogenes L3MBTL2 wird an Promotoren rekrutiert, die eine aktive Initiation der Transkription aufweisen. Die mit L3MBTL2 in stabilen Multiproteinkomplexen assoziierten Proteine E2F6 und RING2 sowie monoubiquitiniertes H2A wurden ebenfalls an ausgewählten L3MBTL2 Zielpromotoren nachgewiesen. Innerhalb der Bindungssequenzen von L3MBTL2 wurde die E-Box als das am stärksten überrepräsentierte Motiv ermittelt. L3MBTL2 ist mit dem E-Box-bindenden, heterodimeren Transkriptionsfaktor MGA/MAX in stabilen Multiproteinkomplexen assoziiert. Die Rekrutierung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe erfolgt daher vermutlich nicht über E2F6, sondern wird wahrscheinlich durch MGA/MAX vermittelt. Mithilfe genomweiter Expressionsanalysen wurden Gene mit einer schwachen L3MBTL2-Rekrutierung als spezifisch durch SUMOyliertes L3MBTL2 reprimierte Zielgene identifiziert.

Neben der Analyse der SUMOylierung von L3MBTL2 wurde der Effekt der proteomweiten SUMOylierung auf die Zusammensetzung L3MBTL2-enthaltender

Proteinkomplexe untersucht. Dabei führte die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung zur Stabilisierung von Multiproteinkomplexen. Die SUMOylierung von L3MBTL2 alleine nahm keinen Einfluss auf die Komplexstabilität.

Mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse nach Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Komplexe wurden potentielle Interaktionspartner von L3MBTL2 identifiziert. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 festgestellt werden. Jedoch wurden infolge der Konservierung der proteomweiten SUMOylierung Proteine wie zum Beispiel GMPS, SUPT16H oder SSRP1 identifiziert, die bislang nicht als Interaktionspartner von L3MBTL2 beschrieben wurden. Viele dieser Proteine stellen selbst Substrate der SUMOylierung dar. Daher kann angenommen werden, dass verschiedene SUMOylierte Komplexkomponenten synergistisch auf die Stabilität eines Komplexes wirken. Die Modifikation eines einzelnen Proteins spielt dagegen eine untergeordnete Rolle.

1.2 Abstract

L3MBTL2 belongs to the family of MBT domain proteins. MBT domains are chromatin-reading modules that mediate binding to methylated lysine residues within histone tails. L3MBTL2 acts as a transcriptional repressor and is associated with several multisubunit complexes. In mice, L3MBTL2 is essential for embryonic development and affects proliferation of murine embryonic stem cells.

In this study L3MBTL2 was identified as a substrate for SUMOylation. Mutational analysis demonstrated lysine residues 675 and 700 in the most C-terminal region of the protein to be specifically modified with SUMO2/3. *In vitro* SUMOylation experiments identified PIAS1 as an E3 ligase of L3MBTL2 SUMOylation. Functional analysis showed that SUMOylation of L3MBTL2 neither affects binding of L3MBTL2 to methylated histone tails nor its recruitment to chromatin.

The genome-wide binding sites of endogenous L3MBTL2 as well as overexpressed wild-type and SUMOylation-deficient L3MBTL2 were identified by ChIP-seq. L3MBTL2 is recruited to promoters that possess an active initiation of transcription. E2F6 and RING2, both stably associated with L3MBTL2, as well as monoubiquitinated H2A were also present at selected L3MBTL2 target promoters. The E-box emerged to be the most overrepresented motif within L3MBTL2 binding sequences. L3MBTL2 is stably associated with the heterodimeric E-box-binding transcription factor MGA/MAX. Thus, the recruitment of L3MBTL2-containing complexes presumably does not occur via E2F6, but is likely mediated by MGA/MAX. Genome-wide expression analysis revealed weakly bound L3MBTL2 target genes to be specifically repressed by SUMOylated L3MBTL2.

Besides analyzing the role of L3MBTL2 SUMOylation, the effect of proteome-wide SUMOylation on the composition of L3MBTL2-containing complexes was investigated. Conservation of SUMOylation stabilized multisubunit complexes, whereas L3MBTL2 SUMOylation did not affect complex stability.

Mass spectrometry of purified L3MBTL2-containing complexes identified potential interaction partners of L3MBTL2 showing no significant differences between wild-type and mutant L3MBTL2-containing complexes. However, due to conserved SUMOylation several proteins like GMPS, SUPT16H or SSRP1, so far not known to be associated with L3MBTL2, were identified with high confidence. Many of these

proteins themselves are targets for SUMOylation. Thus, it can be proposed that SUMOylation of several proteins rather than SUMOylation of a single protein affects stability of L3MBTL2-containing complexes.

2. Einleitung

2.1 Die posttranslationale Modifikation mit SUMO

Die Regulation der Transkription ist ein Prozess mit zentraler Bedeutung für die Entwicklung und Erhaltung von Zellen, Geweben und Organismen. Im Bereich von Promotoren sowie den proximal und distal dazu gelegenen regulatorischen Sequenzen kommt es dabei zum Zusammenspiel zwischen Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren, einer RNA Polymerase, den mit dieser assoziierten Proteinen sowie Chromatin-remodellierenden und -modifizierenden Enzymen (Levine and Tjian, 2003).

Eine weitere Ebene der Regulation innerhalb der Zelle stellt die posttranslationale Modifikation von Proteinen dar. Dieser im Gegensatz zur transkriptionellen Regulation sehr schnelle und flexible Prozess ermöglicht die zeitnahe Reaktion auf äußere oder entwicklungsbedingte Signale, wobei, je nach Art der Modifikation und des Zielproteins, Veränderungen in der subzellulären Lokalisation, der Aktivität oder der Proteinstruktur des modifizierten Proteins hervorgerufen werden. Zu den bekanntesten posttranslationalen Modifikationen zählen die Methylierung, die Acetylierung, die Glykosylierung, die Phosphorylierung, die Ubiquitinierung und die SUMOylierung.

SUMO (Small Ubiquitin-like MODifier) wurde erstmals als reversible posttranslationale Modifikation des Ran-GTPase-aktivierenden Proteins RanGAP1 beschrieben (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997). Bei SUMO handelt es sich um ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa, das in seiner dreidimensionalen Struktur stark der von Ubiquitin ähnelt (Bayer et al., 1998). In Vertebraten zählt die SUMO Familie vier Mitglieder (SUMO1-4), von denen SUMO1-3 im humanen System ubiquitär exprimiert werden (Melchior, 2000 und darin enthaltene Referenzen). Die Expression von SUMO4 scheint dagegen vor allem auf Nieren, Lymphknoten und Milz beschränkt (Guo et al., 2004), wobei die erfolgreiche Konjugation des Proteins an Substrate nicht abschließend geklärt wurde (Owerbach et al., 2005). Entgegen der räumlichen Struktur zeigt die Primärstruktur der vier SUMO Isoformen nur eine geringe Übereinstimmung mit der von Ubiquitin

(<20%). Innerhalb der Proteinfamilie weisen SUMO2 und SUMO3 eine zu 97% identische Aminosäuresequenz auf, die zu 50% mit der von SUMO1 übereinstimmt (Melchior, 2000 und darin enthaltene Referenzen). Die Unterschiede in der Primärstruktur zwischen SUMO1 und SUMO2/3 spiegeln sich auch in der Wahl der Substrate wider, die häufig eine Spezifität für die Konjugation von SUMO1 oder SUMO2/3 aufweisen (Vertegaal et al., 2006).

Die kovalente Modifikation mit SUMO erfolgt häufig an Lysinresten innerhalb der Konsensussequenz ψ KXE, wobei ψ eine hydrophobe Aminosäure repräsentiert (Rodriguez et al., 2001). Innerhalb eines Substrats können dabei nur ein oder auch verschiedene Lysinreste gleichzeitig mit SUMO modifiziert werden. Neben der ein- oder mehrfachen MonoSUMOylierung ist auch die Ausbildung von PolySUMO-Ketten möglich (Tatham et al., 2001; Yang et al., 2006a).

Der Prozess der SUMOylierung verläuft ähnlich dem der Ubiquitinierung in einer dreistufigen enzymatischen Reaktion (Abbildung 2.1). Dem voraus geht die Reifung von SUMO, das als inaktive Vorstufe mit einer C-terminalen Verlängerung von zwei bis elf Aminosäuren - je nach SUMO Isoform - exprimiert wird. Eine durch SUMO-spezifische Cysteinproteasen (SENPs) katalysierte C-terminale Hydrolyse führt dabei zum Freiwerden der beiden für die Konjugation von SUMO nötigen C-terminalen Glycinreste. Das reife Protein wird mithilfe des heterodimeren E1 Enzyms AOS1/UBA2 ATP-abhängig über eine Thioesterbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe von SUMO und einem Cysteinrest im katalytischen Zentrum von UBA2 an dieses gebunden (Johnson et al., 1997; Desterro et al., 1999; Gong et al., 1999). Im zweiten Schritt der Reaktion wird das aktivierte SUMO Protein vom E1 Enzym auf das konjugierende E2 Enzym UBC9 übertragen. Dabei kommt es erneut zur Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe von SUMO und einem Cysteinrest im katalytischen Zentrum von UBC9 (Desterro et al., 1997; Johnson and Blobel, 1997). Im Gegensatz zur Ubiquitinierung werden die Aktivierung wie auch die Konjugation von jeweils nur einem SUMO-spezifischen E1 bzw. E2 Enzym katalysiert. In einigen Fällen folgt dann der direkte Transfer von SUMO auf ein Akzeptorlysin im Substratprotein, wobei die finale Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe von SUMO und der ϵ -Aminogruppe des Lysinrests ausgebildet wird (Sampson et al., 2001; Bernier-Villamor et al., 2002; Lin et al., 2002). Sehr häufig wird diese Reaktion jedoch durch SUMO-spezifischen E3

Ligasen unterstützt. Deren häufigste Vertreter zählen zur Familie der PIAS Proteine (Johnson and Gupta, 2001; Kahyo et al., 2001).

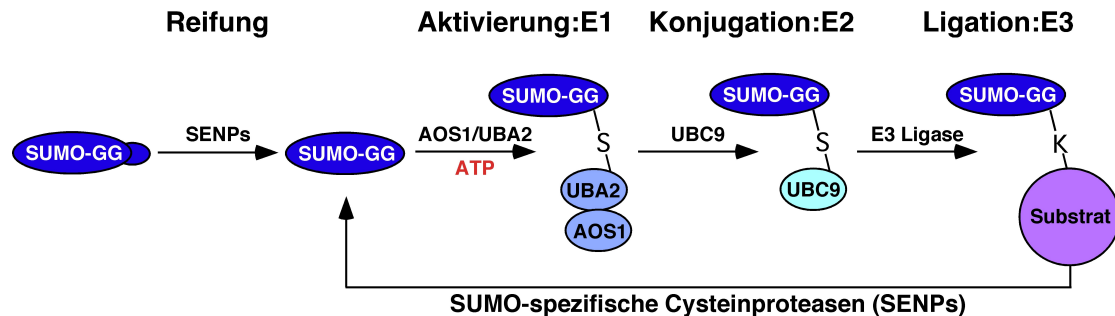


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Mechanismus der SUMOylierung

Nähere Erläuterungen zum Mechanismus der SUMOylierung: siehe Text.

Neben dem klassischen Konsensusmotiv dienen sowohl das Phosphorylierungs-abhängige SUMOylierungsmotiv (PDSM) ψ KXEXXSP (Hietakangas et al., 2006), das von negativ geladenen Aminosäuren abhängige SUMOylierungsmotiv (NDSM) ψ KXEXXEEEE (Yang et al., 2006b) wie auch das inverse Konsensusmotiv D/EXK ψ als Akzeptorstellen einer kovalenten Modifikation mit SUMO. Allerdings können auch Lysinreste außerhalb dieser klassischen Aminosäuresequenzen modifiziert werden. Für die Modifikation solcher Nicht-Konsensus-Lysine spielt der Kontakt zwischen SUMO E3 Ligase und Substrat vermutlich eine besonders wichtige Rolle. Bei der posttranslationalen Modifikation mit SUMO handelt es sich um einen reversiblen und sehr dynamischen Prozess. Der schnelle Wechsel zwischen SUMOylierung und DeSUMOylierung hat zur Folge, dass häufig nur ein geringer Anteil eines Proteins (<5%) in seiner SUMOylierten Form vorliegt. Die DeSUMOylierung erfolgt mithilfe SUMO-spezifischer Cysteinproteasen (SENPs). Diese besitzen, neben einer Hydrolaseaktivität zur Reifung der SUMO Vorstufen, eine Isopeptidaseaktivität zur Spaltung der kovalenten Bindung zwischen SUMO und dem Akzeptorlysin (Li and Hochstrasser, 1999). Im humanen System sind bisher sechs SUMO-spezifische Proteasen beschrieben (SEN1-3, 5-7). Die Spezifität der Enzyme für bestimmte Substrate und SUMO-Isoformen kann zum Teil auf deren subzelluläre Lokalisation zurückgeführt werden (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007 und darin enthaltene Referenzen).

In den vergangenen Jahren wurden mithilfe proteomweiter Analysen zahlreiche Proteine unterschiedlicher Funktion als Substrate einer kovalenten Modifikation mit SUMO identifiziert (Golebiowski et al., 2009; Matic et al., 2010; Westman et al., 2010; Bruderer et al., 2011; Galisson et al., 2011). Entsprechend besitzt die SUMOylierung wichtige Aufgaben bei zentralen zellulären Prozessen wie der Transkription, der Replikation, der Zellteilung und der Reparatur von DNA-Schäden (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007 und darin enthaltene Referenzen). Die Modifikation mit SUMO hat dabei in Abhängigkeit des Substrats sehr unterschiedliche Folgen. Diese können neben der intrazellulären Lokalisation (Matunis et al., 1996) auch die Aktivität (Sapetschnig et al., 2002) sowie die Stabilität (Desterro et al., 1998) des jeweiligen Proteins betreffen.

Daneben beeinflusst die SUMOylierung Interaktionen zwischen Proteinen (Mahajan et al., 1997; Girdwood et al., 2003; Pfander et al., 2005). Diese SUMO-abhängigen Interaktionen werden entweder direkt durch die hinzugewonnene Interaktionsfläche oder indirekt über eine SUMO-vermittelte intramolekulare Konformationsänderung des Substrats ermöglicht. Im ersten Fall kommt es zu einer direkten, nicht-kovalenten Wechselwirkung zwischen dem kovalent an sein Substrat gebundenen SUMO und einem spezifischen SUMO-Interaktionsmotiv (SIM) innerhalb des interagierenden Proteins (Minty et al., 2000; Kerscher, 2007). Ein SIM zeichnet sich durch eine hydrophobe Kernsequenz (V/I,X,V/I,V/I) aus, die N- oder C-terminal von sauren Aminosäuren umgeben ist und teilweise durch phosphorylierte Serinreste ergänzt wird (Song et al., 2004). Das Modell der SUMO/SIM-vermittelten Interaktion liefert eine mögliche Erklärung für die, trotz der SUMOylierung nur weniger Moleküle eines Proteins, häufig starken Auswirkungen auf dessen Funktion. Dabei wird angenommen, dass bestimmte Protein-Protein Interaktionen in Abhängigkeit der SUMOylierung eines oder beider Interaktionspartner ausgebildet werden. Nach dem Zustandekommen der SUMO-vermittelten Interaktion wird diese jedoch vermutlich durch stabilere Wechselwirkungen ersetzt. Neben der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen kann die SUMOylierung in selteneren Fällen auch Wechselwirkungen unterbinden (Zheng and Yang, 2004). Dabei können Bindungsstellen durch die Konjugation von SUMO maskiert oder Interaktionen durch eine Konformationsänderung des Substrats infolge der SUMOylierung verhindert werden.

2.2 Der Mechanismus der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression am Beispiel des Transkriptionsfaktors Sp3

Der Transkriptionsfaktor Sp3 zählt zur Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren. Alle neun Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen drei C-terminal gelegene Zinkfinger auf (Abbildung 2.2), welche die Bindung an GC-Boxen (GGGGCGGGG) im Bereich von Promotoren und distal dazu gelegenen regulatorischen Sequenzen vermitteln (Suske, 1999). Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 besitzen zudem zwei N-terminal gelegene Glutamin-reiche Aktivierungsdomänen und werden ubiquitär bzw. in vielen Geweben exprimiert (Suske, 1999; Bouwman and Philipsen, 2002).

Sp3 wird in Form von vier, im Bereich der N-Termini verschieden langen, Isoformen exprimiert, von denen die beiden langen zwei Aktivierungsdomänen, die beiden kurzen Isoformen nur eine Aktivierungsdomäne enthalten (Suske, 1999; Sapetschnig et al., 2004). Allen vier Isoformen gemein ist die für Sp3 charakteristische und unter den Sp-Faktoren einmalig vorkommende inhibitorische Domäne. Diese befindet sich zwischen der zweiten Aktivierungsdomäne und den Zinkfingern von Sp3 (Abbildung 2.2) und enthält ein klassisches SUMO-Konsensusmotiv (IK₅₅₁EE), dessen Lysinrest *in vitro* wie auch *in vivo* als Akzeptorstelle für die kovalente Modifikation mit SUMO dient (Sapetschnig et al., 2002, 2004). Nach transienter Überexpression von Sp3 und SUMO wurde dabei keine Präferenz für die Konjugation von SUMO1 oder SUMO2 festgestellt. Jedoch zeigten Mutationsstudien, dass neben Lysin 551 auch das Glutamat an Position 553 eine essentielle Funktion für die SUMOylierung von Sp3 besitzt (Sapetschnig et al., 2002).

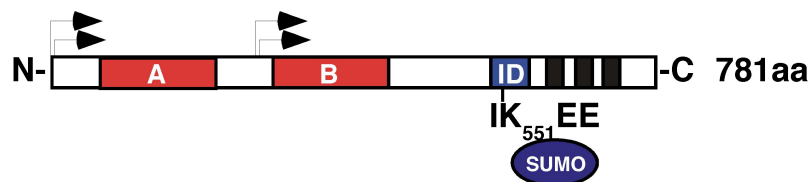


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von Sp3

Glutamin-reiche Aktivierungsdomänen A und B (rot), inhibitorische Domäne (ID, blau), Zinkfinger (schwarz), SUMO (blau). Die N-Termini der vier Isoformen wurden durch Pfeile markiert. Daneben wurde die SUMO-Konsensussequenz IKEE mit dem Akzeptorlysin an Position 551 hervorgehoben.

In Abhängigkeit des jeweiligen Promotors ist Sp3 in der Lage, die Transkription positiv oder negativ zu beeinflussen (Suske, 1999). Die SUMOylierung von Sp3 spielt dabei eine entscheidende Rolle, da sie den Transkriptionsfaktor in einen transkriptionellen Repressor verwandelt. Jedoch beeinflusst die SUMOylierung von Sp3 weder die Spezifität oder Affinität der DNA-Bindung noch die subzelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors (Sapetschnig et al., 2002). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass SUMOyliertes Sp3 SUMO-abhängige Korepressoren rekrutiert, welche ihrerseits zu Veränderungen der Chromatinstruktur und somit zur Repression der Transkription führen (Hay, 2005). Mithilfe eines genomweiten RNA-Interferenz (RNAi) Screens in *Drosophila* Zellen wurden unter anderem das Chromatin-remodellierende Enzym dMi-2 sowie das Polycomb-Protein dSfmbt als SUMO-abhängige Korepressoren von Sp3 identifiziert (Stielow et al., 2008a). Neben ihrer Verbindung zur transkriptionellen Regulation (Murawsky et al., 2001; Klymenko et al., 2006) waren beide Proteine im Nukleus lokalisiert, wiesen selbst keine DNA-bindenden Eigenschaften auf und zeigten keinen Einfluss auf die SUMOylierung von Sp3. Die häufig mit transkriptioneller Repression einhergehende Aktivität von Histondeacetylasen wurde trotz der Assoziation von dMi-2 mit dem NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase) Komplex für die Sp3-vermittelte Repression ausgeschlossen (Stielow et al., 2008a).

Basierend auf den Ergebnissen der Analysen in Insektenzellen ergaben Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIPs) in humanen Zellen, dass auch die Säuger-Orthologen von dMi-2 und dSfmbt, Mi-2 und L3MBTL2, in Abhängigkeit von SUMOyliertem Sp3 an einen Reportergenpromotor rekrutiert werden (Abbildung 2.3) (Stielow et al., 2008b). Dazu erfolgt mit L3MBTL1 die Rekrutierung eines weiteren MBT-Domänen Proteins, welches gemeinsam mit L3MBTL2 zur Kompaktierung von Chromatin beiträgt (Trojer et al., 2007, 2011). Neben Mi-2, L3MBTL2 und L3MBTL1 stellen die Histonmethyltransferasen (HMTs) SETDB1 und SUV4-20H, welche die Trimethylierung von H3K9 bzw. H4K20 katalysieren (Schultz et al., 2002; Schotta et al., 2004), weitere am Repressionsmechanismus von SUMOyliertem Sp3 beteiligte Faktoren dar. Die daraus resultierenden lokalen heterochromatischen Strukturen werden von einer Deposition von HP1 Proteinen begleitet (Abbildung 2.3) (Stielow et al., 2008b).

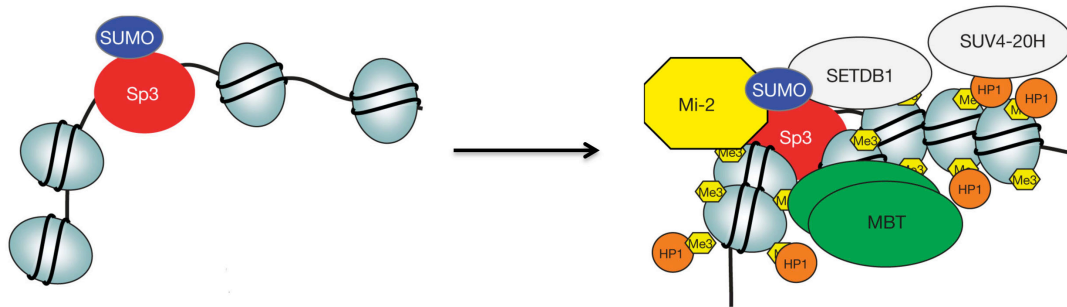


Abbildung 2.3: Modell zur transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 (übernommen von Stielow *et al.*, 2008b)

Nähere Erläuterungen zur transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3: siehe Text.

2.3 MBT-Domänen Proteine und ihre Funktion

Die Transkription geht mit Veränderungen der Chromatinstruktur einher. Dabei spielt die posttranslationale Modifikation von Histonen eine zentrale Rolle. Sie erfolgt vor allem an den freien N-Termini der Histone, wodurch die Zugänglichkeit für Effektorproteine erleichtert wird (Kouzarides, 2007). Diese als „Chromatin reader“ bezeichneten Proteine besitzen konservierte Domänen, die über Taschen- oder Fugen-ähnliche Strukturen an die jeweilige Modifikation binden (Taverna *et al.*, 2007) und direkt oder durch die Rekrutierung weiterer Effektorproteine zur Veränderung der Chromatinstruktur führen. Eine Form der posttranslationalen Modifikation von Histonen ist die Methylierung von Lysinresten, welche als Mono-, Di- oder Trimethylierung auftreten kann. Entsprechend der Position des Lysinrests und dem Grad der Methylierung führt dies entweder zur Aktivierung oder Repression der Transkription. Die 1995 erstmals beschriebene Malignant-brain-tumor (MBT)-Domäne (Wismar *et al.*, 1995) vermittelt die Bindung an mono- und dimethylierte Lysinreste (Kim *et al.*, 2006; Grimm *et al.*, 2007; Kalakonda *et al.*, 2008) und stellt die funktionelle Domäne der gleichnamigen Proteinfamilie dar. Neben MBT-Domänen vermitteln auch Chromo-, Tudor- und PWWP-Domänen die Bindung an methylierte Histone. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit sowie der evolutionären Verwandtschaft werden Chromo-, Tudor-, PWWP- und MBT-Domänen gemeinsam als die „Royal family of chromatin binding domains“ bezeichnet (Maurer-Stroh *et al.*, 2003).

MBT-Domänen treten evolutionär erstmals bei *C.elegans* auf und sind bis hin zum humanen System konserviert (Abbildung 2.4). Die Familie der MBT-Domänen Proteine besitzt drei Vertreter in *C.elegans*, drei in *D.melanogaster* und neun Mitglieder in *H.sapiens*. Die einzelnen Mitglieder der Familie erfüllen Aufgaben bei der Zelldifferenzierung, der Regulation der Mitose sowie der Tumorsuppression (Bonasio et al., 2010 und darin enthaltene Referenzen).

Das *Drosophila* Protein dL(3)mbt (Lethal(3) malignant brain tumor) wurde als erstes MBT-Domänen Protein im Rahmen eines Screens für maligne Transformationen identifiziert (Gateff et al., 1993). Mutationen innerhalb des Proteins führten dabei zur Ausbildung maligner Tumore im larvalen Gehirn (Gateff et al., 1993). Auf molekularer Ebene ist dL(3)mbt in substöchiometrischen Mengen mit dem dREAM (*Drosophila* RBF, dE2F2, and dMyb-interacting proteins) Komplex, welcher an der Repression entwicklungsspezifischer Gene beteiligt ist (Lewis et al., 2004), assoziiert. Neben dL(3)mbt stellen dScm (Sex comb on midleg) (Bornemann et al., 1996) und dSfmbt (Scm-related gene containing four mbt domains) (Klymenko et al., 2006) weitere MBT-Domänen Proteine in *Drosophila* dar. Beide Proteine zählen zur Familie der Polycomb Gruppe, deren Mitglieder entscheidende Aufgaben bei der Repression von HOX Genen und der Entwicklung eines Organismus erfüllen (Francis and Kingston, 2001; Ringrose and Paro, 2004). dScm wirkt als transkriptioneller Repressor (Roseman et al., 2001), der in substöchiometrischen Mengen mit dem Polycomb repressive complex (PRC) 1 assoziiert ist (Saurin et al., 2001). dSfmbt bildet gemeinsam mit dPho (Pleiohomeotic) den Pho repressive complex (PhoRC) (Klymenko et al., 2006). Dieser stellt neben PRC1 und PRC2 einen dritten, nur in *Drosophila* beschriebenen, Polycomb Komplex dar. dScm und dSfmbt interagieren zudem direkt miteinander, werden beide an Polycomb-spezifische Bindungsstellen (Polycomb response elements) rekrutiert und wirken synergistisch auf die Repression von Zielgenen (Grimm et al., 2009). Die biologische Relevanz von dSfmbt zeigt die nach Deletion des Proteins auftretende Letalität im Larvenstadium (Klymenko et al., 2006).

Die Familie humaner MBT-Domänen Proteine zählt neun Mitglieder. Alle Familienmitglieder außer SFMBT1 und SFMBT2 lassen sich entsprechend ihrer Anzahl an MBT-Domänen auf eines der drei *Drosophila* Orthologen dL(3)mbt, dScm und dSfmbt zurückführen. Abbildung 2.4 zeigt die evolutionäre Verwandtschaft sowie die funktionellen Domänen der einzelnen MBT-Domänen Proteine.

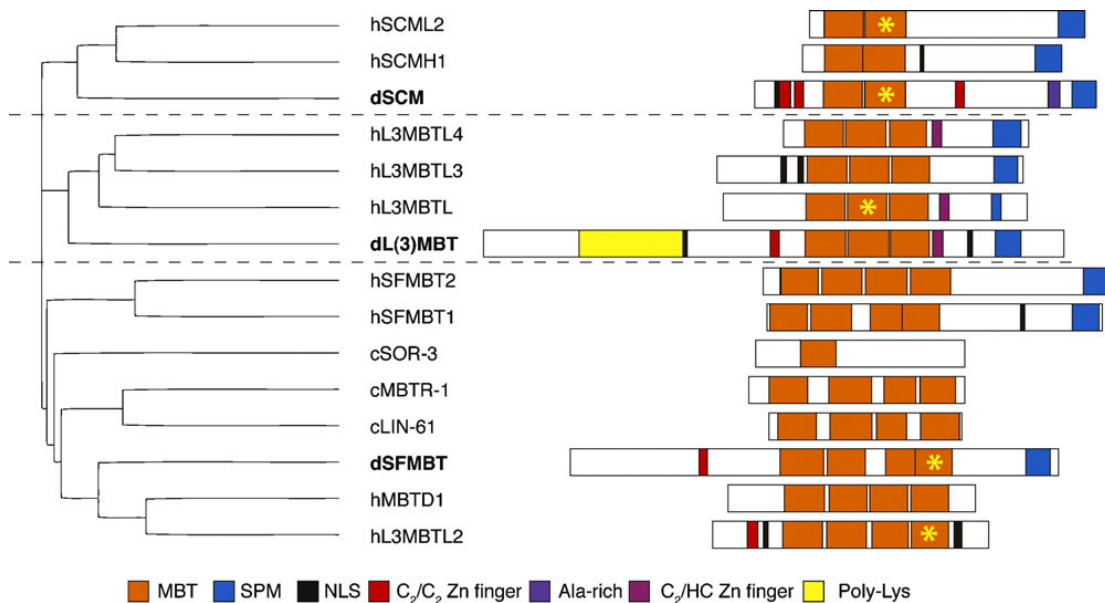


Abbildung 2.4: Evolutionäre Verwandtschaft und schematische Darstellung der MBT-Domänen Proteine von *C.elegans*, *D.melanogaster* und *H.sapiens* (übernommen von Bonasio *et al.*, 2010)

Links: Das Kladogramm zeigt die anhand der Aminosäuresequenz ermittelte evolutionäre Verwandtschaft der MBT-Domänen Proteine von *C.elegans*, *D.melanogaster* und *H.sapiens*. Die drei *Drosophila* Proteine wurden hervorgehoben. **Rechts:** Schematische Darstellung der im Kladogramm aufgeführten MBT-Domänen Proteine. Gelbe Sterne kennzeichnen MBT-Domänen, für die eine direkte Bindung an eine Methylgruppe nachgewiesen wurde. MBT: Malignant-brain-tumor Domäne, SPM: SCM, PH and MBT Homologie Domäne, NLS: Kernlokalisierungssequenz, Zn finger: Zinkfinger, Ala-rich: Alanin-reiche Region, Poly-Lys: Lysin-reiche Region.

Im humanen System stellt das dL(3)mbt Orthologe L3MBTL1 das bislang am besten charakterisierte MBT-Domänen Protein dar (Koga *et al.*, 1999). L3MBTL1 wirkt als transkriptioneller Repressor (Boccuni *et al.*, 2003) und ist mit Rb und HP1 γ assoziiert (Trojer *et al.*, 2007). *In vitro* vermittelt L3MBTL1 die Kompaktierung von Chromatin in Abhängigkeit posttranslationaler Histonmodifikationen (Trojer *et al.*, 2007). Wie dL(3)mbt gilt auch L3MBTL1 als potentieller Tumorsuppressor, dessen fehlerhafte Expression mit verschiedenen Formen der Leukämie in Verbindung gebracht wird (MacGrogan *et al.*, 2004) und dessen Überexpression zu einer abnormen Chromosomen- und Zellteilung führt (Koga *et al.*, 1999). L3MBTL1 Knockout Mäuse weisen allerdings keine abnormen Phänotypen auf (Qin *et al.*, 2010).

Neben L3MBTL1 werden auch L3MBTL2, L3MBTL3, L3MBTL4 und SCML2 potentielle Funktionen bei der Suppression von Tumoren zugesprochen. So wurden

hemi- bzw. homozygote Deletionen von L3MBTL2, L3MBTL3 oder SCML2 in einer signifikanten Zahl von Medulloblastomen nachgewiesen (Northcott et al., 2009). Daneben führte die Deletion von L3MBTL3 aufgrund einer beeinträchtigten Reifung myeloider Vorläuferzellen zur Letalität muriner Embryonen (Arai and Miyazaki, 2005). Der Verlust, die Mutation oder die deregulierte Expression von L3MBTL4 wurde mit Mammakarzinomen in Verbindung gebracht (Addou-Klouche et al., 2010).

2.3.1 Die Struktur der MBT-Domäne

Die MBT-Domäne wurde im Jahr 1995 erstmals von Wismar *et al.* für das *Drosophila* Protein dL(3)mbt beschrieben (Wismar et al., 1995). Es handelt sich um eine stark konservierte, zwischen 99 und 103 Aminosäuren lange Sequenz, die in zwei-, drei- oder vierfacher Wiederholung innerhalb von MBT-Domänen Proteinen auftritt. Eine Ausnahme hiervon bildet das *C.elegans* Protein SOR-3, welches nur eine MBT-Domäne besitzt. Die isolierte MBT-Domäne enthält zwei charakteristische Struktur motive (Abbildung 2.5). Zum einen besteht sie aus einem N-terminalen, zwischen 30 und 50 Aminosäuren langen, flexiblen Arm, der sich aus helikalen Strukturen zusammensetzt. Zum anderen weist sie einen globulären Korb-ähnlichen C-terminalen Bereich auf, der eine Länge von 60 bis 80 Aminosäuren besitzt und vor allem aus β -Faltblättern besteht (Wang et al., 2003). Im Verbund mehrerer MBT-Domänen findet eine Interaktion zwischen dem N-terminalen Arm einer Domäne und dem globulären C-terminalen Bereich der Vorangehenden statt (Sathyamurthy et al., 2003).

Die räumliche Anordnung von MBT-Domänen ist abhängig von ihrer Anzahl (Abbildung 2.5). Zwei aufeinander folgende Domänen nehmen eine Sattel-ähnliche, Form an, die bei allen, auf das *Drosophila* Protein dScm zurückgehenden, MBT-Domänen Proteinen auftritt (Sathyamurthy et al., 2003). dL(3)mbt, L3MBTL1, L3MBTL3 und L3MBTL4 besitzen drei MBT-Domänen, die in einer Kleeblatt- oder Propeller-ähnlichen Struktur angeordnet sind (Wang et al., 2003). Die vier MBT-Domänen von dSfmbt und dessen Orthologen sind in einer unregelmäßigen, rhombischen Form organisiert. Diese setzt sich aus der Propeller-artigen Struktur dreier Domänen und einer sich seitlich daran anfügten vierten Domäne zusammen (Grimm et al., 2009; Guo et al., 2009).

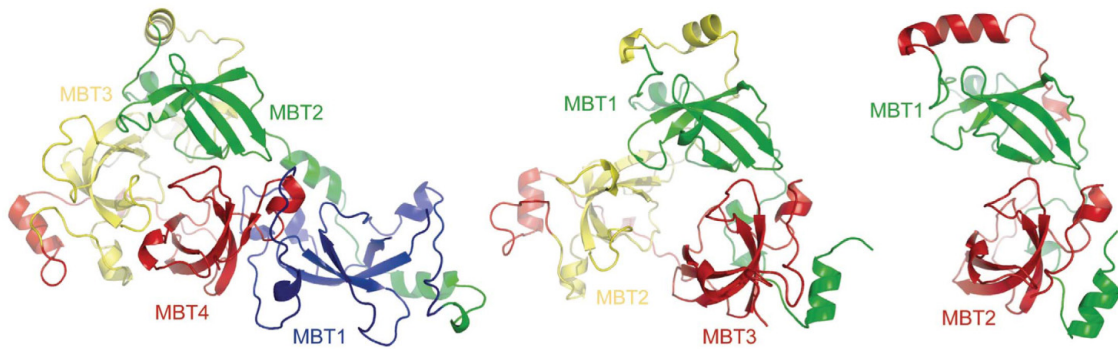


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Kristallstrukturen der MBT-Domänen von dSfmbt, L3MBTL1 und dScm (übernommen von Grimm *et al.*, 2009)

Dargestellt sind die vier MBT-Domänen von dSfmbt (links), die drei MBT-Domänen von L3MBTL1 (Mitte) und die beiden MBT-Domänen von dScm (rechts). Äquivalente Domänen sind durch identische Farben gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen zur Domänenstruktur: siehe Text.

MBT-Domänen vermitteln die Bindung an methylierte Lysinreste innerhalb der N-Termini von Histonen (Kim *et al.*, 2006; Grimm *et al.*, 2007; Kalakonda *et al.*, 2008). Dafür wird im C-terminalen Bereich der MBT-Domäne eine Bindungstasche mit drei konservierten aromatischen Aminosäuren ausgebildet. Die eigentliche Interaktion mit der Methylgruppe erfolgt durch einen konservierten Aspartatrest, der eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Methyl-Ammonium Ion eingeht (Li *et al.*, 2007). Bedingt durch die Struktur der Bindungstasche tritt dabei eine Präferenz für die Bindung von Mono- und Dimethylgruppen auf. Zum einen verhindert der schmale Eingangskanal den Eintritt von Trimethylgruppen, zum anderen ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung nur mit einem freien Proton des Mono- oder Dimethyl-Ammoniums möglich (Li *et al.*, 2007). Trotz der konservierten Struktur von MBT-Domänen zeigten Kristallstrukturen, dass nur eine der MBT-Domänen innerhalb eines Proteins an die Methylgruppe bindet (Min *et al.*, 2007; Grimm *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass diese Bindung möglicherweise eine Konformationsänderung innerhalb des Proteins hervorruft, die eine Interaktion der übrigen MBT-Domänen mit weiteren, noch unbekannten Liganden ermöglicht (Wang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Trojer *et al.*, 2007). Neben der Präferenz für Mono- und Dimethylgruppen erfolgt die Bindung N-terminaler Histonenden unabhängig von der Position des modifizierten Lysinrests (Taverna *et al.*, 2007). Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Beschaffenheit der Bindungstasche, die im Gegensatz zu Fugen-ähnlichen Bindungsdomänen außer mit dem methylierten Lysinrest nur sehr wenig

Kontakt mit benachbarten Aminosäuren aufnimmt (Guo et al., 2009). Aufgrund dieser fehlenden Sequenzspezifität wird vermutet, dass MBT-Domänen nicht der Rekrutierung des Proteins an Chromatin dienen, sondern durch die Bindung methylierter Histone zur Kompaktierung des Chromatins beitragen und in der Folge zur Repression der Transkription führen (Trojer et al., 2007).

2.3.2 Die Struktur und molekulare Funktion des humanen MBT-Domänen

Proteins L3MBTL2

L3MBTL2 (Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 2) repräsentiert eines von neun humanen MBT-Domänen Proteinen und wurde im Jahr 2002 erstmals von Ogawa *et al.* beschrieben (Ogawa et al., 2002). Das 705 Aminosäuren lange Protein stellt das humane Ortholog zum *Drosophila* Protein dSfmbt dar (Guo et al., 2009). L3MBTL2 besitzt vier zentral gelegene MBT-Domänen, deren Kristallisation mit einem H4K20me1-Peptid zeigte, dass die vierte Domäne die Bindung der Methylgruppe vermittelt (Guo et al., 2009). Neben den MBT-Domänen weist L3MBTL2 im Bereich des N-Terminus einen besonderen C₂/C₂-Zinkfinger auf. Dieser bindet ein Zinkion mithilfe von vier Cysteinresten und wird aufgrund eines charakteristischen Aminosäuremotivs aus Phenylalanin (F), Cystein (C) und Serin (S) auch als FCS-Zinkfinger bezeichnet (Lechtenberg et al., 2009). Die Funktion von FCS-Zinkfingern ist noch unklar, jedoch wird vermutet, dass sie die Bindung an nicht-kodierende RNAs vermitteln (Zhang et al., 2004). Im Gegensatz zu dSfmbt und der Mehrzahl der MBT-Domänen Proteine besitzt L3MBTL2 keine SPM-Domäne.

L3MBTL2 zählt wie dSfmbt zur Familie der Polycomb Proteine und wurde erstmals im Rahmen der Aufreinigung E2F6-enthaltender Komplexe aus HeLa-Zellen beschrieben (Ogawa et al., 2002). Einer der identifizierten Komplexe enthält neben E2F6 und L3MBTL2, die Proteine DP1, MGA, MAX, EuHMTase1, G9a, HP1 γ , RING1, RING2, PCGF6 sowie YAF2 und wird zusammenfassend als E2F6.com-1 Komplex bezeichnet (Ogawa et al., 2002). Obwohl HeLa-Zellen nicht in der Lage sind in die G₀-Phase des Zellzyklus einzutreten, erfolgte die Rekrutierung des Komplexes in BJ-1 Fibroblasten erst nach Arretieren der Zellen in der G₀-Phase (Ogawa et al., 2002).

Neben der Assoziation mit dem E2F6.com-1 Komplex wurde L3MBTL2 in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit einer cDNA-Bibliothek aus HeLa-Zellen als direkter

Interaktionspartner der Histondeacetylase HDAC3 identifiziert (Yoo et al., 2010). Darüber hinaus wurde L3MBTL2 als transkriptioneller Repressor beschrieben, dessen repressorische Aktivität in Abhängigkeit der Histondeacetylaseaktivität verstärkt wurde (Yoo et al., 2010).

Eine Komplexreinigung zur Identifizierung L3MBTL2-assoziiierter Proteine in HEK-Zellen zeigte wie bereits Ogawa *et al.* (2002) die stabile Assoziation von L3MBTL2 mit HP1 γ , RING1, RING2, PCGF6 und E2F6 (Trojer et al., 2011). Aufgrund der im Vergleich zum E2F6.com-1 Komplex geringeren Anzahl identifizierter Interaktoren und der Assoziation mit den PRC1 Komponenten RING1, RING2 und PCGF6 wurde dieser Komplex als PRC1-like4 Komplex bezeichnet (Trojer et al., 2011).

Die große physiologische Bedeutung von L3MBTL2 wurde durch die homozygote Deletion des Proteins in Mäusen und embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) belegt (Qin et al., 2012). In Mäusen führte die Deletion von L3MBTL2 zu einer fehlerhaften Gastrulation und in der Folge zur Letalität im Embryonalstadium. L3MBTL2^{-/-} ES-Zellen wiesen eine stark beeinträchtigte Proliferation auf, die mit einer erhöhten Zahl von Zellen in der G_{0/1}-Phase des Zellzyklus einherging. Die Pluripotenz von ES-Zellen wurde hingegen nicht durch L3MBTL2 beeinflusst. Außerdem führte die Differenzierung von L3MBTL2^{-/-} ES-Zellen in „embryoid bodies“ im Vergleich zu wildtypischen Zellen zur Ausbildung kleinerer Kolonien, die nicht in der Lage waren zystische Strukturen auszubilden. Dazu wiesen auch verschiedene Markerproteine aller Keimschichten eine abnorme Expression infolge der Deletion von L3MBTL2 auf (Qin et al., 2012).

Neben der Funktion von L3MBTL2 in der murinen Embryonalentwicklung wurde eine fokale hemizygote Deletion des Proteins auch in einer signifikanten Zahl von Medulloblastomen nachgewiesen (Northcott et al., 2009).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

SUMOyliertes Sp3 führt durch die Ausbildung lokaler heterochromatischer Strukturen zur transkriptionellen Repression seiner Zielgene. L3MBTL2 trägt als Teil dieses Repressionsmechanismus zur lokalen Kompaktierung des Chromatins bei und wurde zu Beginn dieser Arbeit selbst als Substrat der SUMOylierung identifiziert.

Ziel der Arbeit war es daher die molekularen Funktionen der SUMOylierung von L3MBTL2 zu analysieren.

Als Grundlage funktionaler Analysen sollten zunächst die SUMO-Akzeptorlysine des Proteins identifiziert und stabile Zelllinien zur Expression von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 generiert werden. Basierend auf den für L3MBTL2 bereits beschriebenen molekularen Eigenschaften dienten die folgenden Fragestellungen als Ausgangspunkt zur Analyse möglicher Funktionen der SUMOylierung von L3MBTL2: 1) Beeinflusst die SUMOylierung die Affinität oder Spezifität der Bindung von L3MBTL2 an methylierte Histone? 2) Wirkt sich die SUMOylierung von L3MBTL2 auf dessen Rekrutierung an Chromatin aus? 3) Nimmt die SUMOylierung Einfluss auf die repressorische Aktivität von L3MBTL2? 4) Werden endogene Zielgene spezifisch durch wildtypisches oder SUMOylierungs-defizientes L3MBTL2 reguliert? 5) Wirkt sich die SUMOylierung von L3MBTL2 auf die Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen aus? 6) Werden Interaktionen zwischen L3MBTL2 und anderen Proteinen durch die SUMOylierung von L3MBTL2 beeinflusst?

3. Material und Methoden

3.1 Biologische Sicherheit

Alle gentechnischen Arbeiten wurden entsprechend den Richtlinien des Gentechnikgesetzes vom 01.07.1990 durchgeführt. Dabei wurden kontaminierte Materialien und Lösungen getrennt gesammelt und durch Autoklavieren inaktiviert.

3.2 Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden von den im Folgenden aufgeführten Herstellern bezogen:

Abcam, Active Motif, Agilent, Ambion, Bandelin, Bayer, BD Biosciences, Bioline, Biorad, Boehringer Ingelheim, Cell Signaling Technology, Covance, Dharmacon, Diagenode, Dr. Maisch GmbH, Eppendorf, Eurogentec, Fermentas, Finnzymes, Fujifilm, GE Healthcare, Greiner Bio-One, Heraeus, Illumina, Invitrogen, Kobe, LICOR, LP Bio, Macherey Nagel, Merck, Millipore, Molecular Probes, NEW ENGLAND BioLabs, PAA, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Santa Cruz, Sigma, Starlab, Stratagene, Thermo Scientific, Upstate, Whatman.

3.2.1 Antibiotika

Tabelle 3.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml	Bayer
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	Bayer
Puromycin	10 µg/µl	1 µg/ml	BD Biosciences
Zeocin	100 mg/ml	300 µg/ml	Invitrogen
G-418	50 mg/ml	1 mg/ml	Roth

3.2.2 Bakterienstämme und Kulturmedien

DH5 α : *E.coli* Bakterienstamm zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA.

BL21: *E.coli* Bakterienstamm zur induzierbaren Expression von Proteinen. Durch Zugabe von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin wurde die zuvor durch den Tetrazyclin-Repressor inhibierte Expression entsprechender Proteine induziert.

Luri-Bertani(LB)-Medium: 10 g/l Select Peptone 140
5 g/l Select Yeast Extract
10 g/l NaCl

LB-Agarplatten: 15 g Agar/l LB-Medium

LB-Agarplatten mit Antibiotika: 15 g Agar/l LB-Medium
50 μ g/ml Ampicillin bzw. Kanamycin

SOB-Medium: 20 g/l Select Peptone 140
5 g/l Select Yeast Extrakt
584 mg/l NaCl
186 mg/l KCl

SOC-Medium: 10 ml SOB-Medium
100 μ l 2 M Mg²⁺ (1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄)
100 μ l 2 M Glukose

3.2.3 Zellkulturlinien und Kulturmedien

3.2.3.1 Säugerzelllinien

HEK293: Transformierte humane embryonale Nierenepithelzelllinie (Graham et al., 1977). HEK293-Zellen wurden in DMEM/(Ham's F-12) kultiviert.

HEKpGAWG5E1b Klon1: Aus einem Einzelzellklon generierte HEK293 Zelllinie mit stabil integriertem GAL4-abhängigem Luziferase-Reporter (Stielow et al., 2008b). HEKpGAWG5E1b-Zellen wurden in DMEM/(Ham's F-12) mit 1 μ g/ml Puromycin kultiviert.

HeLa: Aus humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms generierte Zelllinie (G. Gey et al., 1952). HeLa-Zellen wurden in DMEM/High Glucose (4,5 g/l) kultiviert.

HeLa-His-SUMO1,2,3: Stabil mit 6xHis-SUMO1,2 bzw. 3 transfizierte HeLa-Zelllinien (Tatham et al., 2009). Die Zellen wurden in DMEM/High Glucose (4,5 g/l) mit 1 µg/ml Puromycin kultiviert.

3.2.3.2 Für die vorliegende Arbeit hergestellte, stabil transfizierte Zelllinien

HEKpGAW-3xFLAG-L3MBTL2wt: Zur stabilen Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 wurden $1,4 \times 10^6$ Zellen der Linie HEKpGAWG5E1b Klon1 auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert und mit 1 µg des linearisierten aufgereinigten Plasmids pN3-3xFLAG-L3MBTL2 transfiziert (siehe auch 3.3.1.4). Die Zellen wurden in DMEM/(Ham's F-12) mit 1 µg/ml Puromycin und 1 mg/ml G-418 kultiviert. Nach Selektion mit G-418 wurden Einzelzellklone isoliert und das Expressionsniveau von 3xFLAG-L3MBTL2 durch Western Blotting untersucht.

HEKpGAW-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R: Zur stabilen Expression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wurden $1,4 \times 10^6$ Zellen der Linie HEKpGAWG5E1b Klon1 auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert und mit 1 µg des linearisierten aufgereinigten Plasmids pN3-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R transfiziert (siehe auch 3.3.1.4). Die Zellen wurden in DMEM/(Ham's F-12) mit 1 µg/ml Puromycin und 1 mg/ml G-418 kultiviert. Nach Selektion mit G-418 wurden Einzelzellklone isoliert und das Expressionsniveau von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R durch Western Blotting untersucht.

3.2.3.3 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12): Zur Kultivierung von HEK-Zellen wurde DMEM/Ham's F-12 Medium (mit stabilem L-Glutamin) der Firma PAA supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum Gold, PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) verwendet.

DMEM/High Glucose (4,5 g/l): Zur Kultivierung von HeLa-Zellen wurde DMEM/High Glucose Medium (mit stabilem L-Glutamin) der Firma PAA supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum Gold, PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) verwendet.

3.2.4 Plasmide

3.2.4.1 Bereits beschriebene Plasmide

Expressionsplasmide für Bakterienzellen

pASK43-L3MBTL2: Vektor zur induzierbaren Expression von 6xHis-L3MBTL2-Strep in *E.coli* unter der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors. Die Induktion erfolgte mithilfe von 200 ng/ml Anhydrotetrazyklin. Das Plasmid wurde von P. Trojer und D. Reinberg zur Verfügung gestellt. Die Selektion in Bakterienzellen erfolgte mit Ampicillin.

pASK43-3MBT: Vektor zur induzierbaren Expression der drei MBT-Domänen von L3MBTL1 in *E.coli* mit N-terminalem 6xHis-Tag. Die Expression steht unter der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors. Die Induktion erfolgte mithilfe von 200 ng/ml Anhydrotetrazyklin. Das Plasmid wurde von P. Trojer und D. Reinberg zur Verfügung gestellt. Die Selektion in Bakterienzellen erfolgte mit Ampicillin.

Expressionsplasmide für Säugerzellen

pSuper.retro: Grundvektor zur Expression von shRNAs unter der Kontrolle des H1 RNA Polymerase III Promotors. Das Plasmid wurde von R. Hay zur Verfügung gestellt. Weitere Informationen finden sich unter www.oligoengine.com. Eine Selektion in Säugerzellen erfolgte mit Puromycin.

pSuper.retro-siRNA-SUMO1: Vektor zur Expression einer gegen SUMO1 gerichteten shRNA unter der Kontrolle des H1 RNA Polymerase III Promotors. Das Plasmid wurde von R. Hay zur Verfügung gestellt. Die Selektion in Säugerzellen erfolgte mit Puromycin.

pTer: Grundvektor zur Expression von shRNAs unter der Kontrolle des H1 RNA Polymerase III Promotors. Das Plasmid wurde von W. Lutz und H. Clevers zur Verfügung gestellt (Van de Wetering et al., 2003). Die Selektion in Säugerzellen erfolgte mit Zeocin.

pTer-siRNA-SUMO2A/pTer-siRNA-SUMO3B: Vektoren zur Expression der gegen SUMO2 bzw. SUMO3 gerichteten shRNAs unter der Kontrolle des H1 RNA Polymerase III Promotors. Beide Plasmide wurden von M. Vollmer generiert (Diplomarbeit M. Vollmer). Die Selektion in Säugerzellen erfolgte mit Zeocin.

pSG-SUMO1/pSG-His-SUMO1/pSG-His-SUMO2: Vektoren zur Expression von SUMO1, 6xHis-SUMO1 bzw. 6xHis-SUMO2 unter der Kontrolle des SV40-

Promotors. Die Plasmide wurden von S. Müller zur Verfügung gestellt. Nähere Information finden sich unter www.addgene.org.

pMCS-Sp3FLnew-HA/pMCS-Sp3FLnew-HA-K551R: Auf dem Plasmid pEGFP-N1 basierende Vektoren zur Expression von Sp3-HA bzw. Sp3-HA-K551R unter der Kontrolle des CMV-Promotors. GFP wurde gegen einen HA-Tag ausgetauscht. Die Plasmide wurden von G. Rischitor generiert (Dissertation G. Rischitor).

pCMV-tag4A-L3MBTL1/pCMV-tag4A-L3MBTL2: Vektoren zur Expression von L3MBTL1-FLAG bzw. L3MBTL2-FLAG unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Plasmide wurden von P. Trojer und D. Reinberg zur Verfügung gestellt (Trojer et al., 2007, 2011).

pCI-neoB-3xFLAG-Mi-2 α : Vektor zur Expression von 3xFLAG-Mi2 α unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid wurde von U. Bauer zur Verfügung gestellt (Saether et al., 2007).

pcDNA3-HA-Mi-2 β : Vektor zur Expression von HA-Mi2 β unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid wurde von U. Bauer zur Verfügung gestellt.

pcDNA3-HA-ESETfl: Vektor zur Expression von HA-ESET unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid wurde von U. Bauer zur Verfügung gestellt.

pSG: Grundvektor zur Expression von Proteinen unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Der Leervektor wurde durch Restriktion von pSG-GAL4-Sp1 mit *BamHI* und *BglII* generiert. Das Plasmid wurde von C. Southgate zur Verfügung gestellt.

pGAL4: Vektor zur Expression der Aminosäuren 1 bis 147 des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 mit N-terminalem HA-Tag. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Das Plasmid wurde von H. Ingraham zur Verfügung gestellt.

Reporterplasmide

pRL-SV40: Reporterplasmid zur konstitutiven Expression der Renilla Luziferase unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Nähere Informationen finden sich unter www.promega.de.

p(UAS)4xtk-Luc: Reporterplasmid zur GAL4-abhängigen Expression der Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors. Das Plasmid wurde von A. Baniahmad und R. Renkawitz zur Verfügung gestellt.

3.2.4.2 Für die vorliegende Arbeit hergestellte Plasmide

Expressionsplasmide für Bakterienzellen

pASK43-L2-K675,700R: Vektor zur induzierbaren Expression der SUMOylierungs-defizienten Mutante von 6xHis-L3MBTL2-Strep in *E.coli* unter der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors. Die Induktion erfolgt mithilfe von 200 ng/ml Anhydrotetrazyklin. Das für L3MBTL2K675,700R kodierende DNA-Fragment wurde mithilfe von *BamHI* und *XhoI* aus dem Vektor pCMV-tag4A-L2fK675,700R ausgeschnitten und mit dem ebenfalls mit *BamHI/XhoI* verdauten Vektor pASK43 ligiert.

pASK43-4xMBT(L2): Vektor zur induzierbaren Expression der vier MBT-Domänen von L3MBTL2 in *E.coli* mit N-terminalem 6xHis- und C-terminalem Strep-Tag. Die Expression steht unter der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors. Die Induktion erfolgt mithilfe von 200 ng/ml Anhydrotetrazyklin. Das Fragment wurde mithilfe spezifischer Primer von dem Template pCMV-tag4A-L3MBTL2 amplifiziert, mit *BamHI* und *XhoI* geschnitten und mit dem ebenfalls *BamHI/XhoI* verdauten Vektor pASK43 ligiert.

Expressionsplasmide für Säugerzellen

pN3-3xFLAG: Grundvektor zur Expression von 3xFLAG-Fusionsproteinen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das hybridisierte, mit *BglIII/HindIII* Überhängen versehene Oligonukleotid wurde mit dem ebenfalls mit *BglIII/HindIII* geschnittenen Plasmid pN3 ligiert.

pN3-3xFLAG-N-TerminusL2: Vektor zur Expression der Aminosäuren 1 bis 290 von L3MBTL2 mit N-terminalem 3xFLAG-Tag unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Fragment wurde mithilfe spezifischer Primer von dem Template pCMV-tag4A-L3MBTL2 amplifiziert, mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und mit dem ebenfalls *EcoRI/KpnI* verdauten Vektor pN3-3xFLAG ligiert.

pN3-3xFLAG-mittleresFragmentL2: Vektor zur Expression der Aminosäuren 290 bis 500 von L3MBTL2 mit N-terminalem 3xFLAG-Tag unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Fragment wurde mithilfe spezifischer Primer von dem Template pCMV-tag4A-L3MBTL2 amplifiziert, mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und mit dem ebenfalls *EcoRI/KpnI* verdauten Vektor pN3-3xFLAG ligiert.

pN3-3xFLAG-C-TerminusL2: Vektor zur Expression der Aminosäuren 499 bis 705 von L3MBTL2 mit N-terminalem 3xFLAG-Tag unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Fragment wurde mithilfe spezifischer Primer von dem Template pCMV-tag4A-L3MBTL2 amplifiziert, mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und mit dem ebenfalls *EcoRI/KpnI* verdauten Vektor pN3-3xFLAG ligiert.

pN3-3xF-N-TermL2-K215R: Vektor zur Expression der Aminosäuren 1 bis 290 von L3MBTL2 mit N-terminalem 3xFLAG-Tag und einer Mutation von K215 zu Arginin. Die Punktmutation erfolgte mithilfe spezifischer Primer auf dem Template pN3-3xF-N-TerminusL2.

pN3-3xF-C-TermL2-K541R/pN3-3xF-C-TermL2-K675R/pN3-3xF-C-TermL2-K700R: Vektoren zur Expression der Aminosäuren 499 bis 705 von L3MBTL2 mit N-terminalem 3xFLAG-Tag und einer Mutation von K541, K675 bzw. K700 zu Arginin. Die Punktmutationen erfolgten mithilfe spezifischer Primer auf dem Template pN3-3xF-C-TerminusL2.

pN3-3xF-C-TermL2-K675,700R/pN3-3xF-C-Term-K541,675,700R: Vektoren zur Expression der Aminosäuren 499 bis 705 von L3MBTL2 mit N-terminalem 3xFLAG-Tag und Mutationen von K675 und 700 bzw. K541, 675 und 700 zu Arginin. Die Punktmutationen erfolgten mithilfe spezifischer Primer auf dem Template pN3-3xF-C-TerminusL2 bzw. pN3-3xF-C-TermL2-K675,700R.

pN3-3xFLAG-L3MBTL2/pN3-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R: Vektoren zur Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das für L3MBTL2 kodierende Fragment wurde mithilfe spezifischer Primer von dem Template pCMV-tag4A-L3MBTL2 bzw. pCMV-tag4A-L2flK675,700R amplifiziert, mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und mit dem ebenfalls *EcoRI/KpnI* verdauten Vektor pN3-3xFLAG ligiert.

pCMV-tag4A-L2flK541R/pCMV-tag4A-L2flK675,700R: Vektoren zur Expression von L3MBTL2-FLAG mit Mutationen von K541 bzw. K675 und 700 zu Arginin. Die Punktmutationen erfolgten mithilfe spezifischer Primer auf dem Template pCMV-tag4A-L3MBTL2.

pGAL4-L1flwt/pGAL4-L2flwt/pGAL4-L2flK675,700R: Vektoren zur Expression von GAL4-L3MBTL1, GAL4-L3MBTL2 bzw. GAL4-L3MBTL2K675,700R unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Die cDNA von L3MBTL1, L3MBTL2 bzw. L3MBTL2K675,700R wurde mithilfe spezifischer Primer von den Templates pCMV-tag4A-L3MBTL1, pCMV-tag4A-L3MBTL2 bzw. pCMV-tag4A-L2K675,700R

amplifiziert, mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und mit dem ebenfalls *HindIII/BamHI* verdauten Vektor pGAL4 ligiert.

3.2.5 Oligonukleotide und Primer

3xFLAG-Oligonukleotide zur Generierung des Vektors pN3-3xFLAG:

5'-*BglIII*-3xFLAG-*HindIII*-3':

GATCTCCACCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATG
ACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGA

5'-*HindIII*-3xFLAG-*BglIII*-3':

AGCTTCTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTTTATAATCAC
CGTCATGGTCTTTGTAGTCCATGGTGGA

siRNAs zur transienten Depletion von L3MBTL2:

siGENOME SMARTpool duplex (1), D-010678-01:

sense: GAUAGUUUCCGGAGUUAUAUU

antisense: 5'-P-UAUAACUCCGGAAACUAUCUU

siGENOME SMARTpool duplex (2), D-010678-01:

sense: GCAGGAAACAGACGACUGAUU

antisense: 5'-P-UCAGUCGUCUGUUUCCUGCUU

siGENOME SMARTpool duplex (3), D-010678-01:

sense: UAACAUGGAUUGCCCAAACUU

antisense: 5'-P-GUUUGGGCAAUCCAUGUUAUU

siGENOME SMARTpool duplex (4), D-010678-01:

sense: GUUAUGAGGCACAGACUUUUU

antisense: 5'-P-AAAGUCUGUGCCUCAUAACUU

Primer

Die Tabelle 3.2 enthält eine Auflistung aller Primer, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Tabelle 3.2: Primer für Klonierungen, Mutagenesen, ChIP-qPCR und RT-qPCR

Klonierungen	Sequenz (5' → 3')
fw_L2_N-term	GCAGGAATTCCGATGGAGAAGCCCCGGAGTAT
fw_L2_middle	TTGGGAATTCTCTTCACCGACTGGAAGGGCTA
fw_L2_C-term	GCATGAATTCTGCCGCCAAAAGGTTATGAGGC
fw_L2_N-term <i>Bam</i> HI	GCAGGGATCCATGGAGAAGCCCCGGAGTAT
rv_L2_N-term	TACGGGTACCTCAGAACTTGGCATGGATGGTCC
rv_L2_middle	TACGGGTACCTCATGGCGGTGTGAGCTCAATGT
rv_L2_C-term	TAGCGGTACCTCAGTCGTCTGTTTCCTGCTTGA
rv_L2_C-term <i>Hind</i> III	TCGCAAGCTTTTAATATTGACTATCACTGG
rv_L2_C-term <i>Xba</i> I	TAGCTCTAGATTAGTCGTCTGTTTCCTGCTTGA
Mutagenesen	Sequenz (5' → 3')
L3MBTL2 K215R fw	GTGGGAGGATGTCATGAAAGGGATGAGGGTGGAGGTGC
L3MBTL2 K215R rv	GCACCTCCACCTCATCCCTTTCATGACATCCTCCAC
L3MBTL2 K433R fw	GGTTTGAGGAAGGGATGAGGCTCGAGGCCATTGAC
L3MBTL2 K433R rv	GTCAATGGCCTCGAGCCTCATCCCTTCCTCAAACC
L3MBTL2 K541R fw	CTTCAAGGTGGGCATGAGGCTCGAGGCCGTGGAC
L3MBTL2 K541R rv	GTCCACGGCCTCGAGCCTCATGCCACCTTGAAG
L3MBTL2 K675R fw	GCTGTGCGTGTTTCGCGAAGAGCATCTAGACGTGGCCTCGCCC
L3MBTL2 K675R rv	GGGCGAGGCCACGTCTAGATGCTCTTCGCGAACACGCACAGC
L3MBTL2 K700R fw	GTCCAGAGCTCCCTGTCTCCGTCGAGAACATCAGGCAGGAAACAG
L3MBTL2 K700R rv	CTGTTTCCTGCCTGATGTTCTCGACGGAGACAGGGAGCTCTGGAC
ChIP-qPCR	Sequenz (5' → 3')
PHF20 Promotor	fw: TGAGTGGGGACTTCGTGTTC rv: GACCAACCGACAGAAGGACT
E2F6 Promotor	fw: CCTGTTCCCTTCCTCTGGAA rv: CGACGCAGACGGAAAAAGAG
RFC1 Promotor	fw: GCCAAAAACCGAGCTCACAC rv: CCATTCGCGCCAACAACCTC
RPA2 Promotor	fw: CACGCCGAACAAAGGAAGTG rv: CAGTTGGCTCCAAAAGCCTC
CYP2R1 Promotor	fw: TCTCAGCCGCGCAAACTAG rv: GCCCTCTTCAGCTCTCCAAA
MFAP1 Promotor	fw: TCATTCGAACCTTCCTCACC rv: AACCGGAAATACGTGACGAG
UXT Promotor	fw: GCACGCCCTAGTCTTCTTTG rv: CCAGCAATAAGAACGGTTGG
CDC7 Promotor	fw: GAGCCACAGAAGTCGTACTC rv: CCGAACCAGATGCTTAGTGC
LOX Promotor	fw: TAACGCTCCCTGTGCAACGT rv: CCTTTCCTCTTCTCAGTCC
CXCL2 Promotor	fw: TAAGGGATCTGACCCACGAC rv: AGTTCGGAAGGAAGGCGATG
ESRP2 Promotor	fw: GACCAGCCCTGGAAGTAGGA rv: CTCTCCAGGCGAGTTACCTG
JAM2 Promotor	fw: TCCACCCCTAGGCTGAAAAG rv: GATCGGCTTTGTGTCTGGTC

Material und Methoden

CDC7 Promotor -2000 Bp	fw: CACCTTCTTACCTCACAGAC rv: GGGTATAGTTCAGGGTGAAG
RT-qPCR	Sequenz (5' → 3')
L3MBTL2	fw: AGGCCAAAGAGGCCACAAAG rv: GCCACGTCTAGATGCTCTTC
PHF20	fw: CTCCAAAAAGGCCCTACCAG rv: TAGTCCAGCCAGCTCTCCAA
E2F6	fw: TGGATGTTCCAGCTCCCAGA rv: TTCTTCCTCAGGGCCTTCTG
RPA2	fw: CCAGGAATGAGTGAAGCAGG rv: TCAGGTACCCAGTTAGATCCA
CYP2R1	fw: GCGATTTCTGGACAGCAGTG rv: TCATGCCTAACCTGGGCTTC
MFAP1	fw: TTCGGGCAAACGGCAAAGTC rv: GACCTGAGCGTCCAAAGTTC
UXT	fw: CACTGGCAGAAGCTCTCAAG rv: CTGCAGGCCTTGTAGTTCTC
CDC7	fw: ACATGTGGTCTGCAGGTGTC rv: TGGGAGTGCTAGAATCCATAC
LOX	fw: CAGTGTAACCCAGCTACC rv: CTTCAGAACACCAGGCACTG
CXCL2	fw: CCTGCAGGGAATTCACCTCA rv: CCTTCCTTCTGGTCAGTTGG
ESRP2	fw: AGATGAGCCGAGTGCTGATG rv: CAGTGGGTGTAGTGAGGTAG
JAM2	fw: CCGTTTGTGGCCTTGGTGTA rv: TTCCATTTCCTCGTGTACCTC
GAPDH	fw: TGCACCACCAACTGCTTAGC rv: GGCATGGACTGTGGTCATGA
B2M	fw: AGTATGCCTGCCGTGTGAAC rv: GGAGCAACCTGCTCAGATAC

3.2.6 Peptide N-terminaler Histonenenden für Peptid-Bindungsstudien

H3K9 (AS 1-15)	ARTKQTARKSTGGKA-C
H3K9me1 (AS 1-15)	ARTKQTAR(Kme1)STGGKA-C
H3K9me2 (AS 1-15)	ARTKQTAR(Kme2)STGGKA-C
H3K9me3 (AS 1-15)	ARTKQTAR(Kme3)STGGKA-C
H4K20 (AS 16-25)	KRHRKVLVDN-C
H4K20me1 (AS 16-25)	KRHR(Kme1)VLVDN-C
H4K20me2 (AS 16-25)	KRHR(Kme2)VLVDN-C
H4K20me3 (AS 16-25)	KRHR(Kme3)VLVDN-C

3.2.7 Rekombinante Proteine und Enzyme

6xHis-AOS1/UBA2: Von A. Sapetschnig aus *E.coli*-Zellen isoliertes und aufgereinigtes, heterodimeres E1 Enzym der SUMOylierungsreaktion. AOS1 wurde als 6xHis-Fusion exprimiert, UBA2 besitzt keinen Tag (Dissertation A. Sapetschnig).

UBC9: Von A. Sapetschnig aus *E.coli*-Zellen isoliertes und aufgereinigtes E2 Enzym der SUMOylierungsreaktion. UBC9 wurde ohne Tag exprimiert (Dissertation A. Sapetschnig).

SUMO1 und SUMO2: Von F. Melchior (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellte, rekombinante, aufgereinigte SUMO Isoformen ohne Tag.

6xHis-PIAS1: Von A. Sapetschnig aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen isoliertes und mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigtes PIAS1 mit N-terminalem 6xHis-Tag (Dissertation A. Sapetschnig).

3.2.8 Antikörper und Antiseren

Primärantikörper

Tabelle 3.3 enthält eine Auflistung aller primären Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Tabelle 3.3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung Western Blot	ChIP
α -Sp1	Millipore	07-645	1:2000	-
α -Sp2 (K-20)	Santa Cruz	Sc-643	1:1000	-
α -Sp3 (D-20)	Santa Cruz	Sc-644	1:2000	-
α -SUMO1	(Matunis et al., 1996)	-	1:2000	-
α -SUMO2/3	(Zhang et al., 2008a)	-	1:2000	-
α -L3MBTL1	LP Bio	AR-0160	1:2000	-
α -L3MBTL2	Active Motif	39569	1:1000 - 1:5000	8 μ l Serum
α -E2F6	Santa Cruz	Sc-22823	1:500	3 μ g
α -RING2	Abcam	Ab101273	1:3000 - 1:5000	3 μ g
α -H2AUbi	Cell Signaling Technology	D27C4	-	2 μ g

Material und Methoden

α -HP1 γ	Millipore	MAB3450	1:1000	-
α -G9a	Millipore	09-071	1:2000	-
α -YY1	Santa Cruz	Sc-7341	1:2000	-
α -Tubulin	Millipore	MAB3408	1:15000	-
α -FLAG	Sigma	F3165	1:2000 - 1:10000	1 μ g
α -5xHis	Qiagen	34660	1:1000	-
α -HA	Roche	11867423001	1:1000 - 1:2000	-
α -GAL4	Covance	PRB-255C	1:2000	-

Sekundärantikörper

Tabelle 3.4 enthält eine Auflistung aller sekundären Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Tabelle 3.4: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung Western Blot
α -rabbit-HRP	GE Healthcare	NA934	1:20000
α -mouse-HRP	GE Healthcare	NA931	1:20000 - 1:30000
α -rat-HRP	GE Healthcare	NA935	1:20000
α -rabbit-Alexa Fluor 680	Molecular Probes	A10043	1:20000
α -rabbit-IRDye680 LT	LI-COR	926-32221	1:15000
α -mouse IRDye800 CW	LI-COR	926-32210	1:15000 - 1:20000

3.3 Methoden

3.3.1 Zellbiologische Methoden

3.3.1.1 Umgang mit Säugerzellen

Alle Arbeiten mit Säugerzellen wurden in steriler Umgebung unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Neben der Verwendung steriler Einwegmaterialien wurden Glaspipetten und -gefäße nach vorheriger Inkubation für zwölf Stunden bei 180 °C eingesetzt. Lösungen und Chemikalien wurden autoklaviert oder steril filtriert.

Zur Aufbewahrung von Zellen wurden diese in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Zellkulturmedium unter Zugabe von 10% DMSO in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum erneuten Kultivieren der Zellen wurden diese bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und das DMSO-haltige Medium nach Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 Minuten entfernt. Das Zellpellet wurde in auf 37 °C vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂.

Zum Umsetzen von Zellen wurden diese mit 1x PBS gewaschen und anschließend durch Auftropfen einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) gefolgt von einer kurzzeitigen Inkubation bei 37 °C von dem Trägermaterial abgelöst. Nach dem Resuspendieren in frischem Medium wurden die Zellen in der jeweils gewünschten Zellzahl auf neue Zellkulturgefäße ausplattiert.

3.3.1.2 Transfektion von Säugerzellen mit DNA

Zur transienten oder stabilen Expression von Proteinen wurden HEK-Zellen mithilfe des lipid-basierten Transfektionsreagenzes FuGENE HD (Roche) mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. FuGENE HD komplexiert mit der DNA und transportiert den Komplex in die Zelle. Die DNA wurde in sterile Reaktionsgefäße vorgelegt, mit serumfreiem Medium (Opti-MEM I, Invitrogen) verdünnt und das Transfektionsreagenz in die Lösung pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde der Transfektionsansatz für 20 bis 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend auf die am Vortag ausplattierten Zellen aufgetropft. Das Verhältnis zwischen DNA-Menge und Volumen des Transfektionsreagenzes betrug 1:3, das Gesamtvolumen des

Transfektionsansatzes wurde entsprechend der Herstellerangaben an die jeweilige Zellzahl angepasst. 10 cm Zellkulturschalen wurden standardmäßig mit 3 µg Gesamt-DNA transfiziert.

3.3.1.3 Transfektion von Säugerzellen mit siRNA

Zur transienten Depletion von endogenem L3MBTL2 wurden Zellen der Linie HEKpGAWG5E1b Klon1 in einer 96-well Zellkulturplatte mit 10 pmol einer Kontroll-siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Control siRNA #1, # D-001810-01 Dharmacon) bzw. 10 pmol eines Pools aus vier gegen L3MBTL2 gerichteten siRNAs (siGENOME SMARTpool L3MBTL2, Dharmacon) mithilfe von Dharmafect Duo (Dharmacon) transfiziert. Die siRNA wurde dafür mit dem gleichen Volumen serumfreien Mediums (Opti-MEM I, Invitrogen) in einem sterilen Reaktionsgefäß verdünnt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden parallel 0,5 µl Dharmafect Duo mit Opti-MEM I auf das der verdünnten siRNA entsprechende Volumen aufgefüllt. Nach kurzem Mischen folgte eine Inkubation beider Ansätze für 5 Minuten bei RT. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 80 µl DMEM/(Ham's F-12) Medium supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (ohne Antibiotika) woraufhin das Gemisch auf die Zellen getropft wurde. Nach 24 Stunden wurde das Antibiotika-freie Medium gegen DMEM/(Ham's F-12) Medium mit 1 µg/ml Puromycin ausgetauscht und nach weiteren 120 Stunden SDS-Gesamtzellextrakte hergestellt.

3.3.1.4 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien aus Einzelzellklonen

Zur stabilen Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wurden die Expressionskonstrukte pN3-3xFLAG-L3MBTL2 und pN3-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R zunächst durch Restriktion mit *AflIII* linearisiert und mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Je $1,4 \times 10^6$ Zellen der Linie HEKpGAWG5E1b Klon1 wurden auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und am Folgetag mit je 1 µg der linearisierten Vektoren transfiziert. Nach 48 Stunden begann die Selektion mit 1 µg/µl G-418, die bis zur Ausbildung von Einzelzellkolonien für zehn Tage weitergeführt wurde. Zur Isolierung von Einzelzellklonen wurden einzelne Kolonien unter dem Mikroskop mithilfe einer Pipettenspitze zusammengeschaubt, aufgenommen und in 24-well Zellkulturplatten mit Selektionsmedium überführt. Nach Resuspendieren der Zellen wurden diese bis zur

Konfluenz kultiviert und anschließend expandiert. Für jede der beiden Zelllinien wurden 23-28 Einzelzellklone isoliert und auf die Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R hin untersucht.

Selektionsmedium: DMEM/(Ham's F-12)
1 µg/ml Puromycin
1 µg/µl G-418

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

3.3.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

Standardmethoden der Molekularbiologie wie die Ethanol-Fällung und die Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren, die Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA, sowie deren Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Standardprotokollen durchgeführt, die der entsprechenden Literatur entnommen werden können.

3.3.2.2 Transformation von *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von *E.coli*-Zellen wurden 50 µl chemisch kompetente NEB 5-alpha *E.coli*-Zellen (High Efficiency, NEW ENGLAND BioLabs) bzw. 200 µl chemisch kompetenter Zellen des Stammes BL21 auf Eis aufgetaut und im Anschluss mit 1-2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes (100 – 200 ng Plasmid-DNA) vermischt. Nach Inkubation für 30 Minuten auf Eis folgte der Hitzeschock für 30-45 Sekunden bei 42 °C. Die transformierten Zellen wurden für 2-5 Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 950 µl bzw. 800 µl auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium für 60 Minuten bei 250 UpM und 37 °C geschüttelt. Abschließend wurden je 200 µl der transformierten Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Zellen des Stammes DH5α wurde das Nucleobond AX System (Macherey Nagel) verwendet. Dazu wurden die Zellen aus 1,5 ml einer Übernachtskultur bei 13000 UpM und RT pelletiert

und in 100 µl S1-Puffer (+RNase) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen erfolgte die Zugabe von 100 µl S2-Puffer. Nach gründlichem Invertieren wurde das Lysat für 5 Minuten bei RT inkubiert. Das Lysat wurde dann durch Zugabe von 100 µl S3-Puffer neutralisiert, erneut invertiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch zweimalige Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 UpM pelletiert und der DNA-haltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 450 µl Isopropanol (100%), woran sich nach gründlichem Vortexen ein zweimaliger Waschschriff mit 75%-igem Ethanol anschloss. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl 10/1 TE gelöst.

Zur Isolation großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präp) wurden die Zellen einer 500 ml Übernacktkultur durch Zentrifugation bei 4000 UpM für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert. Die Plasmid-Präparation erfolgte entsprechend dem Vorgehen im kleinen Maßstab mit 12 ml S1-Puffer (+RNase), 12 ml S2-Puffer und 12 ml S3-Puffer, woran sich die Aufreinigung mittels NucleoBond Xtra Säulen anschloss. Diese wurden mit 6 ml N2-Puffer äquilibriert und im Anschluss mit den filtrierten Proben beladen. Nach dem Waschen der Säule mit 32 ml N3-Puffer wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml N5-Puffer von dieser eluiert. Es folgte eine Fällung der DNA in zwei Schritten. Nach Zugabe von 11 ml Isopropanol und gründlichem Invertieren wurde die ausgefallene DNA bei 4000 UpM für 30 Minuten bei 4 °C pelletiert und in 300 µl 10/1 TE gelöst. Es folgte die Zugabe von 30 µl 1 M NaCl und 825 µl Ethanol (100%). Nach einer Inkubation für etwa eine Stunde bei -20 °C wurde die Plasmid-DNA bei 13000 UpM für 30 Minuten bei RT pelletiert. Das DNA-haltige Pellet wurde zweimal mit 75%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50-200 µl 10/1 TE gelöst.

10/1 TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8
 1 mM EDTA

3.3.2.4 Präparation von RNA aus Säugerzellen

Zur Analyse der Expression von L3MBTL2 Zielgenen wurde RNA aus Säugerzellen mithilfe des RNeasy Mini Systems (Qiagen) isoliert. Dabei wurden neben dem durchgängigen Tragen von Handschuhen RNase-freie Filterspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Arbeitsflächen und Pipetten wurden mit der RNase

Dekontaminationslösung RNaseZap (Ambion) gereinigt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt.

Zur Präparation der RNA wurden die mit 1x PBS gewaschenen Zellen bereits in der Zellkulturschale durch Zugabe von 600 µl RLT Puffer (+ 1% β -Mercaptoethanol) aufgeschlossen und durch wiederholtes Aufziehen mithilfe einer 20 G Kanüle homogenisiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens Ethanol (100%) wurde die vorsichtig durchmischte Probe auf eine RNeasy Mini-Säule geladen und für 15 Sekunden bei 13000 UpM zentrifugiert. Zum Entfernen genomischer DNA wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, 10 µl DNase I zugegeben (in 70 µl RDD-Puffer) und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Es folgten Waschschrte mit 350 µl RW1-Puffer und zweimal 500 µl RPE-Puffer. Die aufgereinigte RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem H₂O von der Säule eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Fragmente aus Plasmiden für die Ligation in andere Vektoren amplifiziert. Als Enzym diente die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes), die aufgrund ihrer Proofreading Funktion den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden weitgehend verhinderte. Entsprechend der Herstellerangaben wurden je Ansatz 4 µl Phusion HF Puffer (5x), 0,4 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,2 µl Phusion Polymerase (2^U/µl), 1 µl forward Primer (10 µM), 1 µl reverse Primer (10 µM) sowie 1 µl Template (50 pg/µl) vereinigt und mit nuklease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem angegebenen Reaktionsschema. Die Temperatur zur Primer-Anlagerung wurde dem GC-Gehalt der Primer und die Elongationszeit der Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst.

Initiale Denaturierung:	98 °C	30 sec	
Denaturierung:	98 °C	5 sec	
Primer-Anlagerung:	60-65 °C	20 sec	30-35 Zyklen
Elongation:	72 °C	15-30 sec/kb	
Finale Elongation:	72 °C	7 min	
Lagerung:	4 °C	∞	

Zur Kontrolle der Amplifikation wurde je 1 µl des generierten PCR-Produkts mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.3.2.6 PCR-basierte Punktmutation von Aminosäuren

Zur gezielten Mutation einzelner Aminosäuren im Rahmen der Identifizierung der SUMO-Akzeptorlysine von L3MBTL2 wurde die entsprechende DNA-Sequenz mithilfe einer PCR-basierten Mutagenese verändert. Für die Mutation einzelner Aminosäuren wurde das QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die gleichzeitige Mutagenese mehrerer Sequenzen erfolgte mithilfe des QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). In beiden Fällen werden Primer, die eine mutierte DNA-Sequenz enthalten, mithilfe der *PfuTurbo* DNA Polymerase in die neu synthetisierten Plasmidstränge eingebaut. Die Template-DNA wird im Anschluss an die PCR mithilfe der *DpnI* Endonuklease abgebaut. Eine Übersicht der verwendeten Primer ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Zur gezielten Mutagenese einer Aminosäure im Protein wurden je 125 ng zweier komplementärer Primer mit 5 µl Reaktionspuffer (10x), 10 ng Template-DNA, 1 µl dNTP-Mix, 3 µl QuickSolution und 1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2,5 U/µl) vermischt und mit Nuklease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem angegebenen Reaktionsschema.

Initiale Denaturierung:	95 °C	1 min	
Denaturierung:	95 °C	50 sec	
Primer-Anlagerung:	60 °C	50 sec	18 Zyklen
Elongation:	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation:	68 °C	7 min	
Lagerung:	4 °C	∞	

Zum Abbau der Dam-methylierten Template-DNA erfolgte die Zugabe von 1 µl *DpnI* (10 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde nach dem Resuspendieren und Zentrifugieren der Proben für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden entsprechend der

Herstellerangaben XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) mit der mutierten doppelsträngigen Plasmid-DNA transformiert.

Im Gegensatz zu einer einfachen Mutation wurde für die Mutation mehrerer voneinander getrennter Sequenzen für jede Mutation nur ein Primer eingesetzt. Dabei muss die Anlagerung aller Primer an den gleichen Strang gewährleistet werden. Nach dem Verdau der Template-DNA entsteht somit ein einzelsträngiges Plasmid, welches erst nach Transformation von Bakterienzellen in seine doppelsträngige Form konvertiert wird. Für die Multimutagenese wurden je 100 ng (1-3 Primer) bzw. 50 ng (4-5 Primer) jedes Primers mit 2,5 µl QuikChange Multi Reaktionspuffer (10x), 50-100 ng Template-DNA, 1 µl dNTP-Mix, 0-0,5 µl QuickSolution und 1 µl QuikChange Multi enzyme blend vermischt und mit Nuklease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem angegebenen Reaktionsschema.

Initiale Denaturierung:	95 °C	1 min	
Denaturierung:	95 °C	1 min	
Primer-Anlagerung:	55 °C	1 min	30 Zyklen
Elongation:	65 °C	2 min/kb	
Lagerung:	4 °C	∞	

Zum Abbau der Dam-methylierten Template-DNA erfolgte die Zugabe von 1 µl *DpnI* (10 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde nach dem Resuspendieren und Zentrifugieren der Proben für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden entsprechend der Herstellerangaben XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) mit der mutierten einzelsträngigen Plasmid-DNA transformiert.

3.3.2.7 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Zur Analyse der Expression von L3MBTL2 Zielgenen wurde mRNA aus HEK-Zellen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und mittels quantitativer PCR analysiert. Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des SuperScript II Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben. Dabei wurden 2

µg aufgereinigte Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo(dT)18-Primer (500 µg/ml) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) vereinigt und mit RNase-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde zur Auflösung möglicher Sekundärstrukturen der RNA für 5 Minuten bei 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 4 µl First-Strand-Puffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNase Out (40 U/µl). Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl SuperScript II RT (200 U/µl). Die Proben wurden für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion folgte eine Inkubation für weitere 15 Minuten bei 70 °C. Die cDNA wurde im Anschluss bei -20 °C gelagert oder in einer Verdünnung von 1:20 direkt als Template einer quantitativen PCR eingesetzt. Eine Übersicht der verwendeten Primer ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

3.3.2.8 Quantitative PCR (qPCR)

Zur quantitativen Analyse der Genexpression nach reverser Transkription oder der Rekrutierung von Proteinen nach Chromatin-Immunpräzipitation wurden die cDNA bzw. die präzipitierten DNA-Fragmente mittels quantitativer PCR analysiert. Während der Amplifikation erfolgt dabei die Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR Green in doppelsträngige DNA. Die Menge des amplifizierten PCR-Produkts kann so nach jedem Zyklus anhand des Fluoreszenzsignals, welches proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts zunimmt, mithilfe geeigneter PCR-Maschinen verfolgt werden.

Für quantitative PCR-Reaktionen wurde das ImmoMix System der Firma Bioline in Verbindung mit SYBR Green (Invitrogen) verwendet. Je Reaktionsansatz wurden 12,5 µl ImmoMix (2x), 0,5 µl SYBRGreen (50x) und je 2,5 pmol des entsprechenden forward bzw. reverse Primers (Endkonzentration jeweils 100 nM) vereinigt und mit Nuklease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden in eine lichtundurchlässigen 96-well Platte (Thermo Scientific) überführt und abschließend je 1 µl der entsprechenden Template-DNA zugegeben. Die Platte wurde abschließend mit einer lichtdurchlässigen Klebefolie (Thermo Scientific) versiegelt, kurz zentrifugiert und mithilfe des Mx3000P Cycler (Stratagene) analysiert. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem angegebenen Reaktionsschema.

Material und Methoden

Initiale Denaturierung:	95 °C	10 min	
Denaturierung:	95 °C	15 sec	
Primer-Anlagerung:	58-68 °C	30 sec	40 Zyklen
Elongation:	72 °C	30 sec	
Denaturierung:	95 °C		
Dissoziationskurve:	60→95 °C	(Gradient)	

Zur Kontrolle der Amplifikation eines spezifischen PCR-Produkts wurde im Anschluss eine Dissoziationskurve erstellt, wobei die Fluoreszenz über einen kontinuierlichen Temperaturgradienten hinweg gemessen wurde.

Die Auswertung der qPCR-Analysen erfolgte anhand des Ct-Wertes (Cycle Threshold value), der den Zyklus darstellt, bei welchem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Zum Vergleich verschiedener PCR-Reaktionen wurde die Differenz (ΔCt) aus zwei Ct-Werten gebildet. Im Fall von RT-qPCR-Analysen wurde diese Differenz nach dem Normalisieren der einzelnen Ct-Werte auf die von *GAPDH* oder *B2M* mithilfe der $2^{-\Delta Ct}$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001) als relative Expression im Vergleich zu mock-Zellen dargestellt. Im Rahmen von Chromatin-Immunpräzipitationen wurde der jeweilige Ct-Wert auf den der Inputprobe normalisiert und mithilfe der $2^{-\Delta Ct}$ Methode der prozentuale Anteil des präzipitierten Materials gegenüber der Input-Probe berechnet.

3.3.3 Biochemische Methoden

3.3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen wurden die Zellen zunächst mit kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die direkte Lyse durch Zugabe von 40 μ l SDS-haltigem Lysispuffer (Verhältnis Lysispuffer I : Lysispuffer II 1:2) je Well einer 6-well Zellkulturplatte. Nach Inkubation für wenige Minuten bei RT wurde das Lysat von der Zellkulturschale abgeschabt und in Reaktionsgefäße überführt. Zur Denaturierung von DNA und Proteinen wurden diese anschließend für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Unlösliche Bestandteile wurden durch

Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 UpM und RT pelletiert und der Gesamtzellextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C. Zur Analyse mittels Western Blotting wurde die Proteinkonzentration des Extrakts mithilfe des Biorad DC Protein Assays bestimmt (siehe 3.3.3.3).

Lysispuffer I: 150 mM Tris, pH 6,7
5% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerin

Lysispuffer II: 25 mM Tris, pH 8,2
50 mM NaCl
0,5% (v/v) NP-40
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) NaN₃

SDS-Lysispuffer: Lysispuffer I : Lysispuffer II (1:2)
1 mM PMSF
0,5x Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Roche)

Zur Analyse stabil transfizierter Einzelzellklone (siehe 3.3.1.4) wurde ein vereinfachter Lysispuffer verwendet. Dabei wurden die Zellen einer 6-well Zellkulturplatte zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50 µl auf 95 °C vorgeheiztem Lysispuffer. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Aufkochen der Proben für 10 Minuten wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 UpM und RT pelletiert und der proteinhaltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80 °C.

Lysispuffer: 50 mM Tris, pH 7,5
2% (w/v) SDS
1 mM PMSF
0,5x PIC

3.3.3.2 Herstellung von Kernextrakten

Zur Aufreinigung und Analyse L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe wurden Kernextrakte aus HEK-Zelllinien nach dem Protokoll von Andrews und Faller (Andrews and Faller, 1991) hergestellt. Zur Konservierung der proteomweiten SUMOylierung wurde den Puffern 20 mM NEM zugesetzt. Zur Herstellung der Kernextrakte wurden Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen zweimal mit kaltem 1x PBS (+/- 20 mM NEM) gewaschen, anschließend in 1 ml kaltem 1x PBS (+/- 20 mM NEM) abgeschabt und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zum Pelletieren der Zellen wurden diese für wenige Sekunden bei 4000 UpM und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Anschwellen der Zellen wurden diese in 1 ml kaltem hypotonem Puffer B (+/- 20 mM NEM) resuspendiert und 7 Minuten auf Eis inkubiert. Nach kurzem Vortexen und mehrfachem Resuspendieren wurden die noch intakten Zellkerne durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 UpM und 4 °C pelletiert. Zur Isolation der Kernproteine wurden die Zellkerne in 250 µl kaltem Puffer C (+/- 20 mM NEM) resuspendiert und für etwa 20 Minuten auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Unlösliche Kernbestandteile wurden durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 UpM und 4 °C abgetrennt und die gelösten Kernproteine in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.3.3.3).

Um im Rahmen der Analyse L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe durch die Interaktion mit RNA oder DNA hervorgerufene Effekte auszuschließen, wurden die Kernextrakte im Vorfeld einer Benzonasebehandlung unterzogen. Dafür wurde der Kernextrakt 1:2,8 mit Verdünnungspuffer auf eine NaCl-Konzentration von 150 mM verdünnt. Im Anschluss wurde die möglicherweise im Kernextrakt enthaltene RNA und DNA durch Zugabe von 50 U_{ml} Benzonase Nuclease (25 U_{µl}, Novagen) für 2 Stunden auf einem Drehrad bei 4 °C vollständig verdaut. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 UpM und 4 °C wurde der Protein-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und direkt für weiterführende Experimente eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Puffer B: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl
1 mM PMSF
0,5x PIC
(20 mM NEM)

Puffer C: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
420 mM NaCl
0,2 mM EDTA
20% (v/v) Glycerin
1 mM PMSF
0,5x PIC
(20 mM NEM)

Verdünnungspuffer: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
20% (v/v) Glycerin
1 mM PMSF
0,5x PIC

3.3.3.3 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von SDS-Gesamtzellextrakten erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry entsprechend dem DC Protein Assay (Biorad), der die Verwendung Detergenzien-haltiger Puffer erlaubt. Im Einzelnen wurden 20 µl Lösung S mit 1 ml Lösung A gemischt (Lösung A'). 100 µl Lösung A' wurden daraufhin zu 20 µl der zu analysierenden Proteinlösung pipettiert und die Probe nach Zugabe von 800 µl Lösung B für mindestens 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm.

Die Proteinkonzentration der Lösung wurde anhand der ermittelten Absorption im Vergleich zu BSA-Standards verschiedener Konzentrationen bestimmt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Kernextrakten erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford, die auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 beruht. Dazu wurde das Bradford-Reagenz (Biorad) zunächst 1:5 mit H₂O verdünnt und anschließend je 500 µl dieser Lösung zu 2 µl der jeweiligen Probe pipettiert. Nach Inkubation der Proben für mindestens 10 Minuten bei RT wurden 300 µl des Reaktionsansatzes in eine 96-well Zellkulturplatte überführt und die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde anhand der ermittelten Absorption im Vergleich zu BSA-Standards bekannter Proteinkonzentration bestimmt.

3.3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinlösungen entsprechend ihres Molekulargewichts wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mithilfe des Mini-PROTEAN Tetra cell Systems der Firma Biorad nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde die entsprechende Proteinlösung durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und kurzzeitiges Aufkochen denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden dann innerhalb eines Sammelgels fokussiert und im Anschluss mithilfe eines Trenngels (5-12% Acrylamidlösung) entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts spezifischer Proteine nach Western Blotting und Immundetektion erfolgte die gleichzeitige Auftrennung eines Größenstandards (PAGE-Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V.

SDS-Probenpuffer (2x):	100 mM Tris, pH 6,8
	4% (w/v) SDS
	0,001% (w/v) Bromphenolblau
	20% (v/v) Glycerin
	5% (v/v) β-Mercaptoethanol

SDS-Probenpuffer (5x):	300 mM Tris, pH 6,8 10% (w/v) SDS 0,05% (w/v) Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin 25% (v/v) β -Mercaptoethanol
Sammelgel:	30% Acrylamidlösung (Roth) (Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1) 1 M Tris, pH 6,8 10% (w/v) SDS 10% (v/v) APS TEMED
Trenngel:	30% Acrylamidlösung (Roth) (Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1) 1,5 M Tris, pH 8,8 10% (w/v) SDS 10% (v/v) APS TEMED
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS

3.3.3.5 Western Blot und Immundetektion immobilisierter Proteine

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinlösungen wurden zur Immundetektion spezifischer Proteine mithilfe des Mini-PROTEAN Tetra cell Systems (Biorad) auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Transfer erfolgte entsprechend den Herstellerangaben bei einer kontinuierlichen Stromstärke von 300 mA für 150 Minuten bei 4 °C. Dabei wurde für die Detektion mittels Chemolumineszenz eine Immobilon-P Membran (Millipore) verwendet, wogegen der Transfer zur Immundetektion durch Fluoreszenz auf eine Immobilon-F Membran (Millipore) erfolgte. Beide Membranen wurden im Vorfeld der Detektion zum Absättigen

unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 1 Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C in Blockierungslösung inkubiert.

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,05% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
1xTBS:	20 mM Tris, pH 7,6 137 mM NaCl
Blockierungslösung:	1x TBS 5% (w/v) Magermilchpulver

Whatman Filterpapier

Immundetektion mittels Chemolumineszenz

Zur Immundetektion mittels Chemolumineszenz wurde die gesättigte Membran einmal in TBST gewaschen und anschließend für ca. 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Antikörperlösung mit dem entsprechenden primären Antikörper auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST folgte die Inkubation in Antikörperlösung mit dem entsprechenden HRP-markierten sekundären Antikörper für maximal 1 Stunde unter Schütteln bei RT. Die Membran wurde daraufhin dreimal mit TBST gewaschen und die von Antikörpern gebundenen Proteine mithilfe des Immobilon HRP-Substrat Western Detection Kits (Millipore) entsprechend der Herstellerangaben detektiert. Alle Waschschritte erfolgten für ca. 5 Minuten auf einem Schüttler bei RT.

Zum Entfernen der Antikörper für eine weitere Detektion wurde die Membran mehrfach mit TBST gewaschen und anschließend für 15-30 Minuten mit dem Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBST erfolgte ein erneutes Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung.

TBST:	1x TBS 0,1% (v/v) Tween 20
Antikörperlösung:	TBST 1% (w/v) Magermilchpulver primärer bzw. sekundärer Antikörper

Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm)

Immundetektion mittels Fluoreszenz

Die Immundetektion mittels Fluoreszenz erfolgte entsprechend der Detektion mittels Chemolumineszenz, wobei ein Fluoreszenz-markierter sekundärer Antikörper eingesetzt und zur Entfernung von Tween 20 ein letzter Waschschrift mit 1x TBS durchgeführt wurde. Die Detektion der Fluoreszenzsignale sowie deren Quantitierung erfolgte mithilfe des LICOR Odyssey Imaging Systems.

3.3.3.6 Nickel-Affinitätschromatographie (Nickel-Pulldown)

Zur Identifizierung SUMOylierter Proteine sowie der SUMO-Akzeptorlysine in L3MBTL2 wurden Nickel-Pulldown Experimente durchgeführt. Dazu wurden verschiedene SUMO-Isoformen als 6xHis-Fusionsproteine in Säugerzellen exprimiert und im Anschluss mit 6xHis-SUMO-modifizierte Proteine über eine Nickel-Affinitätsmatrix aufgereinigt. Die Extraktpräparation wurde zur Inaktivierung SUMO-spezifischer Isopeptidasen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Der Nachweis SUMOylierter Proteine erfolgte mithilfe spezifischer Antikörper nach Western Blotting.

Zur Aufreinigung mit 6xHis-SUMO modifizierter Proteine aus HEK-Zellen wurden 1×10^6 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und am Folgetag mit 1,5 µg eines Expressionskonstrukts des zu analysierenden Proteins gemeinsam mit 1,5 µg eines Vektors zur Expression von 6xHis-SUMO1 bzw. 6xHis-SUMO2 transfiziert. Als Negativkontrolle diente zum einen die alleinige Expression des zu analysierenden Proteins und zum anderen die Koexpression von unfusioniertem SUMO1. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen und im Anschluss durch Zugabe von 1 ml Lysispuffer lysiert. Der Zellextrakt wurde in Reaktionsgefäße überführt und zur Denaturierung der DNA für 15 Minuten im

Wasserbad aufgekocht. Unlösliche Zellbestandteile wurden für 5 Minuten bei 13000 UpM und RT pelletiert und die Proteinlösung zur Präzipitation von mit 6xHis-SUMO-modifizierten Proteinen mit 20 µl (Slurry) Ni-NTA Agarose (Qiagen) bzw. Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen) versetzt. Es folgte eine Inkubation der Proben über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Affinitätsmatrix im Batch-Verfahren bzw. unter Verwendung des MagnaRack (Invitrogen) je dreimal mit 750 µl Waschpuffer A und dreimal mit dem gleichen Volumen Waschpuffer B gewaschen. Dabei wurden die Proben zunächst gevortext und dann für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 750 µl 1x PBS wurde die Agarose in SDS-Probenpuffer (2x) aufgenommen und präzipitierte Proteine mittels Western Blotting und Immundetektion analysiert.

Zur Analyse von endogenem L3MBTL2 wurden stabil mit 6xHis-SUMO1,2 bzw. 3 transfizierte HeLa-Zellen verwendet, so dass eine Transfektion der Zellen überflüssig war. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend des hier beschriebenen Protokolls.

1M Natrium-Phosphat-Puffer pH 8 (100 ml): 93,2 ml 1M Na₂HPO₄
6,8 ml 1 M NaH₂PO₄

1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,4 (100 ml): 25,5 ml 1M Na₂HPO₄
74,5 ml 1 M NaH₂PO₄

Lysispuffer: 6 M CH₅N₃ x HCl
0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8
0,05% (v/v) Tween 20
20 mM Imidazol

Waschpuffer A: 8 M Harnstoff
0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8
0,05% (v/v) Tween 20
20 mM Imidazol

Waschpuffer B:

8 M Harnstoff
0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 6,4
0,05% (v/v) Tween 20
20 mM Imidazol

3.3.3.7 Expression von 6xHis-Fusionsproteinen in *E.coli*

Zur Expression rekombinanter 6xHis-Fusionsproteine wurden *E.coli* BL21 Zellen entsprechend des Protokolls unter 3.3.2.2 mit pASK43-Expressionsvektoren transformiert. Dabei wurde das gesamte Bakterienpellet nach dem Resuspendieren in 200 µl SOC-Medium auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden je Transformation zwei Einzelzellklone gepickt und über Nacht in 2 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 25 °C und 200 UpM geschüttelt. Daraufhin wurden 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit einer der Übernachtskulturen inokuliert und bis zum Erreichen einer optischen Dichte ($\lambda_{550\text{ nm}}$) von 0,5-0,6 bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. 1 ml dieser Bakterienkultur diente als Negativkontrolle der Induktion, wobei die Bakterienzellen pelletiert und anschließend durch Zugabe von 80 µl Puffer W und 20 µl SDS-Probenpuffer (5x) lysiert wurden. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 10 µl Anhydrotetrazyklin (2 mg/ml) für 3 Stunden bei 37 °C und 200 UpM. Zur Kontrolle der Induktion wurde wiederum 1 ml der Bakterienkultur abgenommen und nach dem Anpassen der Zellzahl entsprechend der nicht induzierten Kontrolle behandelt. Die induzierte Bakterienkultur wurde in einen Zentrifugenbecher überführt, für 12 Minuten bei 4000 UpM und 4 °C pelletiert und nach Verwerfen des Überstands bis zur Aufreinigung rekombinanter Proteine bei -80 °C gelagert.

Puffer W:

100 mM Tris, pH 8
150 mM NaCl
1 mM EDTA

SDS-Probenpuffer (5x):

300 mM Tris, pH 6,8
10% (w/v) SDS
0,05% (w/v) Bromphenolblau
50% (v/v) Glycerin
25% (v/v) β -Mercaptoethanol

3.3.3.8 Aufreinigung von 6xHis-Fusionsproteinen mittels Ni-NTA-Agarose

Zur Aufreinigung rekombinanter 6xHis-Fusionsproteine aus transformierten *E.coli*-Zellen wurde das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut und in 4 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert. Nach Überführen der Proben in 15 ml Reaktionsgefäße erfolgte zur Lyse der Zellen die Zugabe von 400 µl Lysozym (10 mg/ml in 1x PBS) und eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurde das Lysat fünfmal für je 10 Sekunden bei 30% Output mithilfe des MS73 (Bandelin) sonifiziert, wobei zwischen jedem Sonifizierungsschritt eine Inkubation auf Eis erfolgte. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4000 UpM und 4 °C pelletiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der 6xHis-Fusionsproteine erfolgte mithilfe von je 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen), welche zuvor durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml kaltem Lysispuffer äquilibriert und abschließend in 500 µl kaltem Lysispuffer aufgenommen wurde. Nach Zugabe der äquilibrierten Agarose zum Zelllysate wurden 6xHis-Fusionsproteine für 70 Minuten bei 4 °C auf einem Drehrad gebunden. Es folgte das Pelletieren der Agarose für 5 Minuten bei 1000 UpM und 4 °C. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Agarose dreimal mit je 4 ml kaltem Waschpuffer gewaschen und zur Elution in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution gebundener Proteine mithilfe von Imidazol erfolgte durch die viermalige Zugabe von je 500 µl Elutionspuffer für je 15-30 Minuten auf einem Drehrad bei 4 °C. Der proteinhaltige Überstand wurde nach dem Pelletieren der Agarose für 2 Minuten bei 4000 UpM und 4 °C in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung der aufgereinigten rekombinanten 6xHis-Fusionsproteine in *in vitro* SUMOylierungs- oder Peptid-Bindungs-Experimenten erfolgte die Dialyse gegen Dialysepuffer.

Lysispuffer:

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8

300 mM NaCl

0,1% (v/v) Tween 20

10 mM Imidazol

2 mM β -Mercaptoethanol

0,5x PIC

1 mM PMSF

1M Natrium-Phosphat-Puffer pH 8 (100 ml): 93,2 ml 1M Na₂HPO₄
6,8 ml 1 M NaH₂PO₄

Waschpuffer:

- 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8
- 300 mM NaCl
- 0,1% (v/v) Tween 20
- 20 mM Imidazol
- 2 mM β -Mercaptoethanol
- 0,5x PIC
- 1 mM PMSE

Elutionspuffer:

- 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8
- 300 mM NaCl
- 0,1% (v/v) Tween 20
- 250 mM Imidazol
- 2 mM β -Mercaptoethanol
- 5% (v/v) Glycerin
- 0,5x PIC
- 1 mM PMSF

Dialysepuffer:

- 10 mM Tris
- 0,1 mM EDTA
- 150 mM NaCl
- 5% (v/v) Glycerin
- 1 mM DTT

Für die *in vitro* SUMOylierung rekombinanter 6xHis-Fusionen von L3MBTL2 wurden ca. 100 ng/ μ l der nach bakterieller Expression aufgereinigten Eluate mit 1,5-3 ng/ μ l 6xHis-AOS1/UBA2, 2,5-5 ng/ μ l UBC9, 5-10 ng/ μ l SUMO1 bzw. SUMO2 und 5-10 mM DTT vereinigt und mit Reaktionspuffer aufgefüllt. Die SUMOylierung von 1 μ g 6xHis-L3MBTL2 erfolgte dabei in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1-2 mM ATP gestartet und erfolgte bei 37 °C. Zur Verfolgung der Reaktionskinetik mittels Western Blotting wurden zu verschiedenen

Zeitpunkten je 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen und mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer (2x) versetzt. Als Negativkontrolle verblieb je ein Ansatz ohne ATP, aus welchem zu den entsprechenden Zeitpunkten ebenfalls Proben entnommen wurden. Zur Analyse des Effekts von PIAS1 auf die Kinetik der SUMOylierung von L3MBTL2 wurden zu je 10 µl des Reaktionsansatzes 1,5 µl einer 1:2 Verdünnung von aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen aufgereinigtem 6xHis-PIAS1 zugegeben. Das eingesetzte Volumen wurde dabei anhand von *in vitro* SUMOylierungs-Experimenten von A. Sapetschnig abgeschätzt (Dissertation A. Sapetschnig). Diente die *in vitro* SUMOylierung zur weiteren Analyse von L3MBTL2 in Peptid-Bindungsstudien erfolgte 20 Minuten nach Reaktionsstart die Zugabe von 1 U Apyrase (0,5 ^U/µl, Sigma)/µmol ATP.

Reaktionspuffer:	20 mM HEPES/KOH, pH 7,3
	110 mM C ₂ H ₃ KO ₂
	2 mM C ₄ H ₆ MgO ₄ x 4H ₂ O
	0,5 mM EGTA
	0,05% (v/v) Tween 20
	0,4 ^{mg} /ml Ovalbumin
	0,5x PIC

3.3.3.10 Peptid-Bindungsstudien (Peptid-Pulldown)

Zur Analyse des Bindungsverhaltens von L3MBTL2 gegenüber N-terminalen Histonden wurden Peptid-Bindungsstudien mit rekombinanten 6xHis-Fusionsproteinen und Peptiden der N-Termini der Histone H3 und H4 (siehe 3.2.6) durchgeführt. Die Kopplung der Peptide erfolgte mithilfe der SulfoLink Coupling Resin (Thermo Scientific), wobei eine stabile Thioether-Bindung zwischen dem C-terminalen Cysteinrest des Peptids und einer an die Agarose gekoppelten Iodacetylgruppe ausgebildet wird. Die Bindungskapazität der Agarose beträgt dabei 1 mg Peptid/ml Agarose. Um während der zahlreichen Waschschriffe den Verlust der Agarose zu verhindern, wurden Überstände während des gesamten Experiments nur bis auf ein Restvolumen von 100 µl abgenommen.

Zur Kopplung der Peptide wurden je 40 µl (Slurry) der Agarose dreimal mit je 1 ml Kopplungspuffer äquilibriert, wobei eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 4000 UpM und RT erfolgte. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand bis auf 100 µl

abgenommen und 5-10 µg des jeweiligen Peptids ($4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in den Kopplungspuffer pipettiert. Die Bindung erfolgte für 30 Minuten bei RT auf einem Drehrad, woran sich eine weitere Inkubation für 60 Minuten bei RT ohne Rotation anschloss. Nicht gebundene Peptide wurden durch viermaliges Waschen mit je 1 ml Kopplungspuffer entfernt. Zum Absättigen freier Iodacetylgruppen wurde die mit Peptiden gekoppelte Agarose in 1 ml Blockpuffer aufgenommen und für 30 Minuten bei RT auf einem Drehrad sowie für weitere 60 Minuten bei RT ohne Rotation inkubiert. Zum Entfernen des überschüssigen L-Cysteins wurde die Agarose zunächst 6-8x mit je 1 ml Waschpuffer, dreimal mit 1 ml H₂O und abschließend mit 1 ml kaltem Bindungspuffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils für 2 Minuten bei 4000 UpM und RT. Vor der Inkubation mit den zu analysierenden rekombinanten Proteinen wurde die gekoppelte Agarose in 350 µl kaltem Bindungspuffer zusammen mit 50 µl BSA ($10 \text{ mg}/\text{ml}$) aufgenommen und freie Bindungsstellen durch Inkubation für 1 Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad gesättigt. Im Fall der Analyse von SUMOyliertem L3MBTL2 erfolgte parallel zum Blocken der Agarose die *in vitro* SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 (siehe 3.3.3.9). Im Anschluss wurde die gesättigte Agarose in 900 µl kaltem Bindungspuffer (+ 1 mM PMSF, 0,5x PIC) aufgenommen und das zu analysierende rekombinante, aufgereinigte 6xHis-Fusionsprotein zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad. Im Fall der Verfolgung der Reaktionskinetik wurden unabhängige Ansätze für 5, 15, 30 bzw. 60 Minuten auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Proteine wurden die Proben sechsmal mit je 1 ml kaltem Bindungspuffer gewaschen und die Agarose abschließend in 20 µl SDS-Probenpuffer (2x) aufgenommen. Die Analyse der Bindung erfolgte mittels Western Blotting und anschließender Immundetektion.

Kopplungspuffer: 50 mM Tris, pH 8,5
5 mM EDTA

Blockpuffer: Kopplungspuffer
50 mM L-Cystein

Waschpuffer: 1 M NaCl

Bindungspuffer:	25 mM Tris, pH 8
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,5% (v/v) NP 40

3.3.3.11 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Als Grundlage der Identifizierung genomweiter Bindungsstellen von L3MBTL2 mittels ChIP-Seq sowie zur Validierung der erhaltenen Ergebnisse wurden Chromatin Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei werden DNA-Bereiche in räumlicher Nähe zu einem bestimmten Protein durch Formaldehyd kovalent vernetzt und die entsprechenden DNA-Protein-Komplexe mittels Immunpräzipitation isoliert. Abschließend erfolgt die Analyse der aufgereinigten DNA-Fragmente durch qPCR mithilfe spezifischer Primer oder mittels „deep sequencing“. Die Durchführung der ChIP-Experimente erfolgte mithilfe des OneDay ChIP Kits (Diagenode) entsprechend der Herstellerangaben, wobei je Immunpräzipitation 100 µg geschertes Chromatin und 2-3 µg Antikörper eingesetzt wurden.

Zur Isolation des Chromatins wurden $2-3 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und am Folgetag durch Zugabe von 1% Formaldehyd ins Medium für 10 Minuten bei RT fixiert. Die Reaktion wurde durch die weitere Zugabe von 125 mM Glycin abgestoppt und die Zellen für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem 1x PBS wurden diese zur Lyse in 500 µl kaltem Puffer B abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurden gleiche Zelllinien vereinigt und für 5 Minuten bei 2000 UpM und 4 °C pelletiert. Die Zellkerne wurden in 450 µl Puffer C resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Chromatin in 60 µl Puffer D (+ 0,5x PIC) resuspendiert und für 10-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Chromatin zweimal für je 6 Minuten mithilfe des Bioruptors (Diagenode) sonifiziert (30`` on-30`` off) und das gescherte Chromatin in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Unlösliche Bestandteile wurden für 10 Minuten bei 13000 UpM und 4 °C pelletiert. Der Chromatin-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA-Konzentration am Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) gemessen. 2 µl jeder Probe wurden zur Kontrolle der Fragmentlänge des gescherten Chromatins mit 18 µl Puffer D und 1 µl 5 M NaCl versetzt, mit Öl überschichtet und für mindestens 5 Stunden bei 65 °C inkubiert. Die Analyse der Fragmentlängen erfolgte mithilfe einer

Agarose-Gelelektrophorese. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Analyse der Rekrutierung bestimmter Proteine an spezifische DNA-Sequenzen wurde mithilfe von qPCR-Analysen (3.3.2.8) und den in Tabelle 3.2 aufgeführten Primern analysiert.

Puffer B: 10 mM HEPES/KOH, pH 6,5
10 mM EDTA
0,5 mM EGTA
0,25% (v/v) Triton X-100

Puffer C: 10 mM HEPES/KOH, pH 6,5
200 mM NaCl
10 mM EDTA
0,5 mM EGTA

Puffer D: 50 mM Tris, pH 8
10 mM EDTA
1% (w/v) SDS
0,5x PIC

3.3.3.12 ChIP-Sequenzierung (ChIP-Seq)

Zur Identifizierung der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 wurden Chromatin Immunpräzipitationen (3.3.3.11) durchgeführt und die isolierten DNA-Fragmente in Kollaboration mit Maren Scharfe und Michael Jarek vom Helmholtz Zentrum Braunschweig in einer Hochdurchsatz-Plattform mittels „deep sequencing“ analysiert. Dabei werden die aufgereinigten DNA-Fragmente zunächst an ihren Enden mit Oligonukleotid-Adaptoren ligiert und anschließend an einem Trägermaterial fixiert. Durch Amplifikation der fixierten Fragmente entstehen für jedes Fragment klonale Cluster, die im Hochdurchsatz-Verfahren parallel sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen werden abschließend mit einem Referenzgenom verglichen, wobei die Gesamtzahl der sequenzierten Nukleotide eines Clusters eine Aussage über die Bindung des ursprünglich präzipitierten Proteins zulässt.

Als Ausgangsmaterial zur Erstellung einer Sequenzierungs-Bibliothek wurden je Immunpräzipitation 10 ng präzipitierter DNA eingesetzt. Die DNA wurde zuvor

entsprechend der Herstellerangaben mithilfe des QIAquick PCR purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Amplifikation der aufgereinigten DNA-Fragmente erfolgte mithilfe des ChIP-Seq DNA Sample Prep Kit (Illumina), die abschließende Sequenzierung der generierten Bibliothek mithilfe des Genome Analyzers Iix (Illumina). Sowohl die Amplifikation der DNA-Fragmente als auch deren Sequenzierung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt (Illumina). Zur Auswertung der erhaltenen Rohdaten wurden diese zunächst dedupliziert und anschließend mithilfe des Bowtie Programms (Version 0.12.7) (Langmead et al., 2009) mit dem humanen Genom abgeglichen. Dabei wurden zwei Fehlpaarungen je Read toleriert. Reads, die mit mehreren Bereichen des Genoms übereinstimmten, wurden von der Analyse ausgeschlossen (-m 1 -k 1). Anhand der Position der Reads relativ zum Genom wurden mithilfe des MACS-Algorithmus (Version 1.4.0rc2 20110214) (Zhang et al., 2008b) die entsprechenden Peaks identifiziert. Dabei wurden solche Peaks ausgeschlossen, die eine FDR >0,001 oder mehr als 100 Reads in einer der beiden Kontroll-Sequenzierungen aufwiesen. Die Datensätze der H3K4me3 (accession no. GSM945288) und der RNA Polymerase II GRO-Seq (accession no. GSM935534) wurden mit dem humanen Genom abgeglichen und entsprechende Peaks mithilfe des MACS Algorithmus identifiziert. Die *de novo* Motivsuche erfolgte mithilfe des MEME-ChIP Algorithmus (Machanick and Bailey, 2011) und des Centrimo Programms (Version 4.8.1) (Bailey and Machanick, 2012). Die erhaltenen Motive wurden mittels TOMTOM (Gupta et al., 2007) mit Bindungsmotiven bekannter Transkriptionsfaktoren verglichen. Die dafür verwendeten Daten stammten von JASPAR (Vlieghe et al., 2006), UniProbe (Newburger and Bulyk, 2009) und Matbase (Genomatrix). Die funktionale Analyse erfolgte im Vergleich zu definierten Gendatensätzen mithilfe des Fischer Exakt Tests unter Verwendung der Datenbanken MsigDB (Subramanian et al., 2005), DAVID 6.7 (Huang et al., 2009) und der Pathway interaction database (Schaefer et al., 2009). Genomsequenzen, Annotationen und Homologiedaten wurden von Ensembl revision 65 abgerufen.

3.3.3.13 Dualer Luziferase-Assay

Zur Analyse des Effekts der SUMOylierung von L3MBTL2 auf die Expression eines Reportergens wurde ein dualer Luziferase-Assay mithilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Firefly-Luziferase katalysiert die Oxidation ihres Substrats

Luziferin zu Oxyluziferin, die Renilla-Luziferase die Oxidation von Coelenterazin. In beiden Fällen werden infolge der Oxidation Photonen proportional zur Menge der exprimierten Enzyme freigesetzt.

Im einzelnen wurden 6×10^4 Zellen auf 24-well Zellkulturplatten ausplattiert und am Folgetag mit 200 ng eines GAL4-abhängigen Firefly-Luziferase-Reporterkonstruktes, 0,5 ng eines konstitutiv aktiven Renilla-Luziferase-Reporterkonstruktes sowie 250 ng eines Expressionskonstrukts des zu analysierenden GAL4-Fusionsproteins transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von je 200 µl Passivem Lysispuffer (1:5 mit H₂O verdünnt) für 15 Minuten auf einem Schüttler bei RT lysiert. Zur Messung der Luziferase-Aktivitäten wurden je 20 µl des Gesamtzellextrakts in Sarstedt-Röhrchen überführt und die Enzymaktivitäten mithilfe des Berthold Autolumat plus LB 953 mit Injektionsvorrichtung bestimmt. Dabei erfolgte nach Injektion von 100 µl Luziferase Assay Reagent II zunächst für 10 Sekunden die Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität. Deren Lichtemission wurde im Anschluss durch Injektion von 100 µl des Substrats der Renilla-Luziferase im Stop&Glo-Puffer gequentscht. Es folgte die Messung der Aktivität der Renilla-Luziferase für weitere 10 Sekunden. Abschließend wurden die Werte der Firefly-Luziferase zum Ausgleich möglicher Schwankungen der Transfektionseffizienz sowie unterschiedlicher Zellzahlen auf die der Renilla-Luziferase normalisiert. Dargestellt wurde die relative Firefly-Luziferase-Aktivität gegenüber mock transfizierten Zellen.

3.3.3.14 Microarray

Zur Identifizierung endogener Zielgene von L3MBTL2 wurden Microarray-Analysen in Kollaboration mit Dr. Michael Krause vom IMT in Marburg durchgeführt. Dazu wurden je 500 ng der präparierten Gesamt-RNA (3.3.2.4) amplifiziert und mithilfe des two-colour Quick-Amp Labelling Kits (Agilent) markiert. Es folgte die Hybridisierung der markierten RNA mit einem SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray (G4851A-028004, Agilent). Sowohl die Markierung als auch die Hybridisierung wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Agilent). Die erhaltenen Rohdaten wurden unter Anwendung der LOESS-Methode normalisiert und die Agilent Sonden dem humanen Genom zugeordnet. Das Expressionsniveau jedes Zielgens wurde im Vergleich zu einer Mischung aller RNAs analysiert und als dereguliert klassifiziert, wenn eine mindesten 1,5-fache Änderung der Expression

gegenüber der in mock-Zellen vorlag, die durchschnittliche log Fluoreszenzintensität 5 und der p-Wert $\leq 0,05$ betrug. Die funktionale Analyse erfolgte im Vergleich zu definierten Gendatensätzen mithilfe des Fischer Exakt Tests unter Verwendung der Datenbanken MsigDB (Subramanian et al., 2005), DAVID 6.7 (Huang et al., 2009) und der Pathway interaction database (Schaefer et al., 2009).

3.3.3.15 Anti-FLAG Immunpräzipitation von Proteinen aus Kernextrakten

Zur Analyse von Protein-Interaktionen mit L3MBTL2 wurden α -FLAG Immunpräzipitationen (IP) mit Kernextrakten durchgeführt, welche im Vorfeld gegen IP-Puffer dialysiert wurden. Je IP wurden 750 μ g dialysierten Kernextrakts eingesetzt. Im Fall der Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Komplexe diente die Elutionsfraktion der Anionenaustauschchromatographie als Ausgangsmaterial der IP. Um unspezifisch an die Agarose bindende Proteine im Vorfeld der IP zu entfernen, erfolgte ein Preclearing mit 20 μ l (Slurry) Mouse IgG-Agarose (Sigma). Diese wurde zunächst durch viermaliges Waschen mit je 200 μ l kaltem IP-Puffer äquilibriert. Die Zentrifugation erfolgte für 2 Minuten bei 2000-3000 UpM und 4 °C. Der äquilibrierten Agarose wurden 750 μ g des dialysierten Kernextrakts zugegeben und die Proben für 90 Minuten bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Das Preclearing entfiel nach Aufreinigung der Kernextrakte mittels Anionenaustauschchromatographie. Während des Preclearings erfolgte das Äquilibrieren von je 20 μ l/250 μ l (Slurry) Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) entsprechend dem Äquilibrieren der Mouse IgG-Agarose. Nach dem Preclearing wurde die Mouse IgG-Agarose durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 3000 UpM und 4 °C pelletiert und der gereinigte Überstand bzw. die dialysierte Elutionsfraktion der Anionenaustauschchromatographie auf die vorbereitete Anti-FLAG Agarose pipettiert. Die Bindung erfolgte für 2-3 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad. Im Anschluss wurde die Agarose für 2-10 Minuten bei 2000-3000 UpM und 4 °C pelletiert und der Überstand abgenommen. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Anti-FLAG Agarose 4-5x mit je 400 μ l/5 ml kaltem Waschpuffer entsprechend vorheriger Waschschrte gewaschen, wobei zwischen jedem Waschschrst eine Inkubation für 5 Minuten auf einem Drehrad bei 4 °C erfolgte. Gebundene Proteine wurden abschließend mithilfe von 3xFLAG Peptiden (5 μ g/ μ l) eluiert. Dafür wurden die Peptide zunächst mit Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l verdünnt. Die Elution erfolgte 5-6x für je 30 Minuten bei

1000-1200 UpM und 4 °C im Thermomixer (Eppendorf) mit je 2 µg/20 µg 3xFLAG-Peptid. Die Eluate wurden vereinigt und zur Analyse mittels Western Blotting mit SDS-Probenpuffer (2x, ohne β-Mercaptoethanol) versetzt oder nach Präzipitation der Proteine für 10 Minuten bei 1200 UpM und 4 °C mit 100 µl StrataClean Resin (Stratagene) für eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

IP-Puffer:

- 25 mM HEPES/KOH, pH 7,9
- 12,5 mM MgCl₂
- 200 mM NaCl
- 0,1 mM EDTA
- 10% (v/v) Glycerin
- 0,1% (v/v) NP 40
- 1 mM PMSF
- 0,5x PIC

Waschpuffer:

- 25 mM HEPES/KOH, pH 7,9
- 12,5 mM MgCl₂
- 300 mM NaCl
- 0,1 mM EDTA
- 10% (v/v) Glycerin
- 0,08% (v/v) NP 40
- 1 mM PMSF
- 0,5x PIC

Verdünnungspuffer:

- 50 mM Tris, pH 7,4
- 420 mM NaCl

3.3.3.16 Gelfiltration von Kernextrakten

Zur Analyse des Effekts der SUMOylierung auf die Zusammensetzung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe wurden Gelfiltrationen unter Verwendung einer Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser auch als Größenausschlusschromatographie bezeichneten Methode werden Proteine bzw. Proteinkomplexe anhand eines Zusammenspiels aus Molekulargewicht und räumlicher Struktur aufgetrennt.

Zur Analyse L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe wurden 400-600 µg Kernextrakt in einem Volumen von 100-200 µl auf die Säule appliziert und mithilfe des Äkta purifier Systems (GE Healthcare) in Gelfiltrationspuffer300 mit einer Flussrate von 0,3-0,4 ml/min aufgetrennt. Nach dem Applizieren der Probe erfolgte die Fraktionierung der im Eluat enthaltenen Proteine mithilfe des Frac-950 Systems (GE Healthcare) in einem Volumen von jeweils 500 µl. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden durch Zugabe von jeweils 5 µl StrataClean Resin (Stratagene) für 30 Minuten auf einem Drehrad bei 4 °C präzipitiert und abschließend durch Western Blotting analysiert.

Gelfiltrationspuffer300:	10 mM HEPES/KOH, pH 7,6
(steril filtriert)	300 mM KCl
	1,5 mM MgCl ₂
	0,5 mM EGTA
	10% (v/v) Glycerin
	0,2 mM DTT
	1 mM PMSF

3.3.3.17 Ionenaustauschchromatographie von Kernextrakten

Bei der Ionenaustauschchromatographie handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen anhand ihrer Nettoladung. Zur Auftrennung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Dabei werden Proteine bzw. Proteinkomplexe mit einer negativen Nettoladung über elektrostatische Wechselwirkungen an ein positiv geladenes Säulenmaterial gebunden und entsprechend der Stärke dieser Wechselwirkung bei verschiedenen Cl⁻-Konzentrationen von der Säule eluiert. Die Durchführung der Chromatographie mithilfe einer HiTrap Q FF Anionenaustauscher-Säule (GE Healthcare) in Verbindung mit dem Äkta purifier System (GE Healthcare) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die jeweiligen KCl-Konzentrationen wurden automatisiert über verschiedene Mischungsverhältnisse zwischen Q0- und Q1000-Puffer eingestellt. Im Vorfeld der Chromatographie wurden die Kernextrakte gegen Q100-Puffer dialysiert. Zur Bestimmung der KCl-Konzentration, bei welcher L3MBTL2-enthaltende Proteinkomplexe von der Säule eluiert werden, wurden 1,5 mg NEM- und Benzonase-

behandelten Kernextrakts in Gegenwart von 100 mM KCl in einem Volumen von 5 ml auf eine HiTrap Q FF Anionenaustauscher-Säule (1 ml, GE Healthcare) appliziert. Die anschließende Elution erfolgte in Fraktionen von jeweils 5 ml bei 250 mM, 400 mM und 550 mM KCl mithilfe des Frac-950 Systems (GE Healthcare). Aus jeder Fraktion wurden 500 µl des Eluates mit je 20 µl StrataClean Resin (Stratagene) für 15 Minuten bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert und präzipitierte Proteine mittels Western Blotting analysiert.

Zur Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Komplexe wurden 60 mg NEM- und Benzonase-behandelten Kernextrakts in Gegenwart von 100 mM KCl in einem Volumen von 28 ml mithilfe eines Superloops (50 ml, GE Healthcare) auf eine HiTrap Q FF Anionenaustauscher-Säule (5 ml, GE Healthcare) appliziert. Das anschließende Waschen der Säule in Gegenwart von 200 mM KCl sowie die Elution bei 550 mM KCl erfolgte in Volumina von je 30 ml, welche mithilfe des Frac-950 Systems (GE Healthcare) gesammelt wurden. Aus jeder Fraktion wurden 18 µl der Probe entnommen und nach Zugabe von je 4,5 µl SDS-Probenpuffer (5x) mittels Western Blotting analysiert. Das übrige Elutionsfraktion wurde bei -80 °C gelagert und für eine anschließende α -FLAG Immunpräzipitation eingesetzt.

Q100-Puffer :	20 mM Tris, pH 8
	100 mM KCl
	1 mM MgCl ₂
	10% (v/v) Glycerin
	1 mM DTT
	0,2 mM PMSF
	1 mM Na ₂ S ₂ O ₅

Q0-Puffer:	20 mM Tris, pH 8
(steril filtriert)	1 mM MgCl ₂
	10% (v/v) Glycerin
	1 mM DTT
	0,2 mM PMSF
	1 mM Na ₂ S ₂ O ₅

Q1000-Puffer :	20 mM Tris, pH 8
(steril filtriert)	1 M KCl
	1 mM MgCl ₂
	10% (v/v) Glycerin
	1 mM DTT
	0,2 mM PMSF
	1 mM Na ₂ S ₂ O ₅

3.3.3.18 Massenspektrometrie

Zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von L3MBTL2 wurden aufgereinigte L3MBTL2-enhaltende Proteinkomplexe in Kollaboration mit Dr. Jeroen Demmers vom Erasmus University Medical Center in Rotterdam mittels Nanoflow LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry) untersucht. Bei dieser Art der Analyse werden Peptide bei einer sehr geringen Flussrate (200-1000 ^{nl}/min) chromatographisch aufgetrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Für die Flüssigchromatographie wurde dabei eine Säule mit Umkehrphase verwendet, wobei die Auftrennung mithilfe einer unpolaren Matrix und einem polaren Puffer erfolgte.

Im Einzelnen wurden die nach 3xFLAG-Elution präzipitierten Proteine in 25 µl SDS-Probenpuffer (2x) aufgenommen, durch Zugabe von 5 mM DTT reduziert und anschließend in Lösung mit Trypsin (Sequencing Grade, Promega) verdaut. Die generierten Peptide wurden im Rahmen einer Nanoflow LC-MS/MS mithilfe des EASY-nLC Systems (Thermo Scientific) in Verbindung mit einem Q Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert. Dazu wurde das Peptidgemisch über einen Zeitraum von 70 Minuten bei einer Flussrate von 200 ^{nl}/min mithilfe einer ReproSil C18 reversed phase Säule (Dr. Maisch GmbH) über einen linearen Gradienten von 0-80% Puffer B aufgetrennt. Das Eluat wurde unmittelbar in die ESI-Quelle (Elektrospray-Ionisation) des Massenspektrometers gesprüht und die zugehörigen Massenspektren ermittelt. Anhand der generierten Rohdaten wurden Peaklisten mithilfe des Proteome Discoverer 1.3 Programms (Thermo Scientific) erstellt und mithilfe des Mascot Algorithmus (Version 2.2, MatrixScience) mit der Uniprot Datenbank (release 2012_07.fasta, taxonomy: *Homo sapiens*) abgeglichen. Als Kriterien wurden eine Peptidtoleranz von 15 ppm und eine Fragment-

Material und Methoden

ionentoleranz von 20 mmu gewählt. Der Ausschlusswert der Mascot Analyse für eine positiven Proteintreffer lag bei 65.

Puffer A: 0,1% (v/v) Methansäure

Puffer B: 80% (v/v) Acetonitril
0,1% (v/v) Methansäure

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung Sp3-abhängiger Korepressoren als Substrate der SUMOylierung

Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIPs) in Säugerzellen zeigten im Vorfeld dieser Arbeit, dass die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors Sp3 zur spezifischen Rekrutierung Chromatin-assoziiierter Proteine und der Ausbildung lokaler heterochromatischer Strukturen führt. Zu den durch Sp3-SUMO rekrutierten Korepressoren zählen das Chromatin-remodellierende Enzym Mi-2, die Histonmethyltransferasen SETDB1/ESET und SUV4-20H, HP1 Proteine, sowie die MBT-Domänen Proteine L3MBTL1 und L3MBTL2 (Stielow et al., 2008b).

4.1.1 Nachweis der SUMOylierung von endogenem Sp3 mit SUMO2/3

Neben Sp3 und den beschriebenen Korepressoren wurden durch ChIP-Experimente mit SUMO1- und SUMO2/3-spezifischen Antikörpern sowohl SUMO1 als auch SUMO2/3 am Promotor eines Reportergens nachgewiesen (Stielow et al., 2008b). Die Isoformen zwei und drei wurden zusammengefasst, da aufgrund ihrer großen Homologie mithilfe des verwendeten Antikörpers keine Unterscheidung der beiden Proteine möglich war. Basierend auf der Beobachtung, dass sich verschiedene SUMO-Isoformen zusammen mit Sp3 an einem Promotor befinden, wurde untersucht, mit welcher der Isoformen Sp3 *in vivo* modifiziert wird. Dazu erfolgte die transiente Depletion von endogenem SUMO1 bzw. SUMO2/3 in HEK-Zellen durch RNA-Interferenz. Im Anschluss an die Depletion wurde der SUMOylierungsstatus von Sp3 in Gesamtzellextrakten mittels Western Blotting analysiert (Abbildung 4.1).

Wie Abbildung 4.1 A zeigt, führte nur die Depletion von SUMO2/3 zum Verlust der SUMOylierten langen und kurzen Isoformen des Transkriptionsfaktors. Somit wird Sp3 *in vivo* spezifisch mit SUMO2/3 modifiziert. Beim Nachweis mit SUMO1-modifizierter Proteine trat in allen Proben eine diskrete Proteinbande hervor. Hierbei handelt es sich vermutlich um das Kern-Poren-Komplex-assoziierte Protein RanGAP1, das präferentiell mit SUMO1 modifiziert wird (Matunis et al., 1996;

Mahajan et al., 1997). Die Detektion von SUMO2/3 wies kaum diskrete Proteinbanden auf, zeigte jedoch eine deutliche Anhäufung modifizierter Proteine im hochmolekularen Bereich. Dies ist vermutlich ein Hinweis auf eine verstärkte PolySUMOylierung durch SUMO2/3, welches selbst eine interne SUMO-Konsensus-Sequenz enthält und somit in der Lage ist, SUMO-Ketten auszubilden (Tatham et al., 2001).

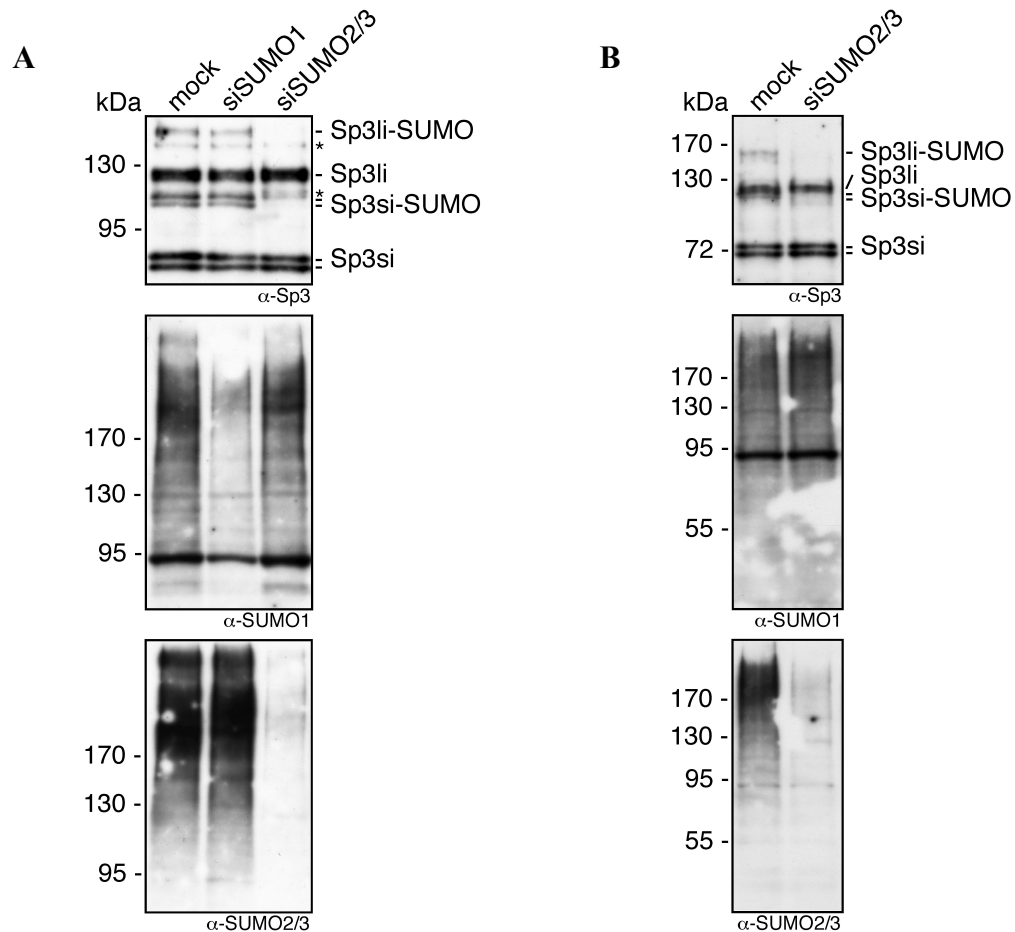


Abbildung 4.1: Endogenes Sp3 wird *in vivo* mit SUMO2/3 modifiziert

A) Zur transienten Depletion von endogenem SUMO1 bzw. SUMO2/3 wurden HEK-Zellen in 6-well Zellkulturschalen mit je 2 μ g des Leervektors pSuper.retro, 2 μ g pSuper.retro-siRNA-SUMO1 oder gemeinsam mit je 1 μ g pTer-siRNA-SUMO2A und pTer-siRNA-SUMO3B transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Selektion der mit pSuper.retro transfizierten Zellen durch Zugabe von 1 μ g/ml Puromycin. Die mit pTer transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 300 μ g/ml Zeocin selektioniert. Nach weiteren 96 Stunden wurden SDS-Gesamtzellextrakte hergestellt, von denen jeweils 20 μ g Protein in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mit α -Sp3, α -SUMO1 bzw. α -SUMO2/3 Antikörpern analysiert wurden. **B)** Parallel zu A) durchgeführte Transfektion von HEK-Zellen in 6-well Zellkulturschalen mit 2 μ g des Leervektors pTer. Das weitere

Vorgehen erfolgte wie in A. Der Knockdown von SUMO2/3 entspricht dem aus A. Die SDS-Gesamtzellextrakte wurden in einem 8%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und im Anschluss mit α -Sp3, α -SUMO1 bzw. α -SUMO2/3 Antikörpern detektiert.

Sp3li: lange Isoformen von Sp3, Sp3si: kurze Isoformen von Sp3, *: unspezifische Banden

Die Identifizierung der spezifischen Modifikation von Sp3 mit SUMO2/3 *in vivo* korreliert mit funktionellen Daten aus Reporter-gen-Experimenten, in denen ausschließlich die transiente Depletion von SUMO2 zu einer Sp3-abhängigen Aktivierung des Reportergens führte (Diplomarbeit M. Vollmer). Aufgrund des SUMO2-spezifischen Effekts in Reporter-gen-Experimenten kann daher vermutet werden, dass bereits die Depletion von SUMO2 zum Verlust der Sp3-SUMOylierung führt und der Transkriptionsfaktor *in vivo* mit SUMO2 konjugiert vorliegt.

4.1.2 Nickel-Affinitätschromatographie zur Identifizierung SUMOylierter Proteine

Wie bereits beschrieben, wurde in ChIP-Experimenten sowohl SUMO1 als auch SUMO2/3 zusammen mit Sp3 und den Sp3-SUMO-abhängig rekrutierten Korepressoren auf einem Reporter-gen-promotor nachgewiesen. In Abschnitt 4.1.1 wurde gezeigt, dass Sp3 selbst *in vivo* spezifisch mit SUMO2/3 modifiziert wird. Daher wurde vermutet, dass auch ein oder mehrere der rekrutierten Korepressoren Substrate einer kovalenten Modifikation mit SUMO darstellen.

Um die Frage einer möglichen SUMOylierung für einige der in Abhängigkeit von SUMOyliertem Sp3 rekrutierten Korepressoren zu untersuchen, wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie (Nickel-Pulldown) in HEK-Zellen durchgeführt. Dazu erfolgte die Koexpression des zu analysierenden Proteins zusammen mit 6xHistidin-Fusionen von SUMO1 bzw. SUMO2 (6xHis-SUMO). Die Extraktpräparation wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, so dass der Verlust einer möglichen SUMOylierung durch SUMO-spezifische Isopeptidasen verhindert wurde. Alle mit 6xHis-SUMO-modifizierten Proteine wurden daraufhin mithilfe einer Nickel-NTA-Matrix gebunden und aufgereinigt. Um hierbei die spezifische Präzipitation der mit 6xHis-SUMO konjugierten Proteine sicherzustellen, wurden zwei Kontrollansätze durchgeführt. Zum einen erfolgte die Expression des zu analysierenden Korepressors alleine, zum anderen die Koexpression von unfusioniertem SUMO1. In beiden Fällen

sollte kein Signal in den über die Nickel-Matrix aufgereinigten Proben auftreten. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden in SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und die entsprechenden Korepressoren nach Western Blotting mithilfe spezifischer Antikörper auf eine SUMOylierung hin untersucht (Abbildung 4.3).

Um die Spezifität der Affinitätschromatographie nachzuweisen und eine artifizielle Modifikation von Lysinresten auszuschließen, wurde der Nickel-Pulldown zunächst mit wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem Sp3 durchgeführt (Abbildung 4.2 A).

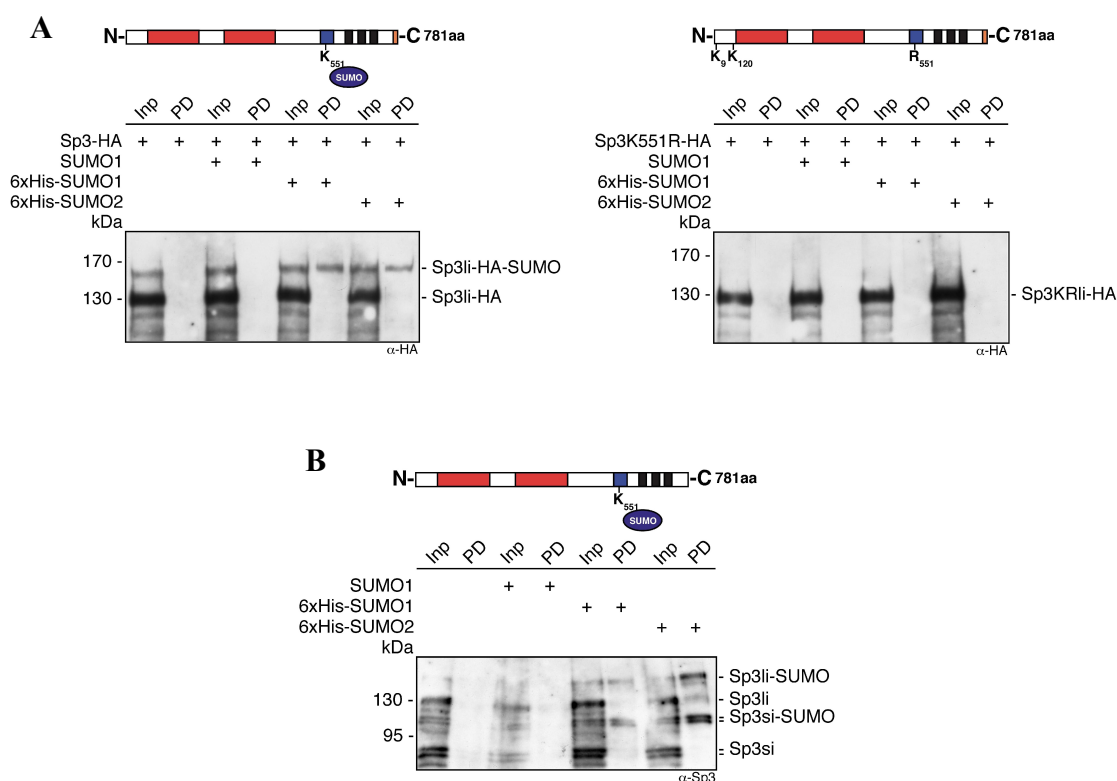


Abbildung 4.2: Sp3 wird spezifisch an Lysin 551 mit 6xHis-SUMO modifiziert

A) Nachweis der Spezifität des Nickel-Pulldowns am Beispiel von Sp3 HEK-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit 3 µg pMCS-Sp3FLnew-HA bzw. pMCS-Sp3FLnew-HA-K551R oder je 1,5 µg der für Sp3 kodierenden Konstrukte zusammen mit je 1,5 µg pSG-SUMO1, pSG-His-SUMO1 oder pSG-His-SUMO2 transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Extraktpräparation unter denaturierenden Bedingungen. Nach Zugabe von je 20 µl magnetischer Nickel-NTA-Agarose wurden in einer über Nacht durchgeführten Affinitätschromatographie mit 6xHis-SUMO-modifizierte Proteine präzipitiert. Durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer wurden diese denaturiert und von der Agarose gelöst. Nach der Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel und anschließendem Western Blotting erfolgte der Nachweis der langen Isoform von Sp3 mit einem α-HA Antikörper. Input: 10%

B) Nachweis der Modifikation von endogenem Sp3 mit 6xHis-SUMO HEK-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und drei von vier Schalen mit 1,5 µg pSG-SUMO1, pSG-His-SUMO1 oder pSG-His-SUMO2 transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie in A) unter Verwendung von Nickel-NTA-Agarose. Endogenes Sp3 wurde mithilfe eines α -Sp3 Antikörpers nachgewiesen. Input: 10%

Proteinschemata Q-reiche Transaktivierungs-Domänen (rot), inhibitorische Domäne (blau), Zinkfinger (schwarz), HA-Tag (orange); K: Lysine innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen

Die Koexpression der langen Isoform von wildtypischem Sp3 mit 6xHis-SUMO1 bzw. 6xHis-SUMO2 zeigte in beiden Fällen die SUMOylierung von Sp3 in Form einer Proteinbande höheren Molekulargewichts. Durch die Affinitätsreinigung wurde ausschließlich mit 6xHis-SUMO-modifiziertes Sp3 präzipitiert und damit die Spezifität der Aufreinigung nachgewiesen. Nach Überexpression von SUMO erfolgte entgegen der Situation *in vivo* auch die Modifikation von Sp3 mit 6xHis-SUMO1. Die Konjugation von 6xHis-SUMO1 kann dabei vermutlich auf die Zunahme von frei in der Zelle verfügbarem SUMO1 infolge der Überexpression zurückgeführt werden. Im Fall der SUMOylierungs-defizienten Mutante von Sp3 trat trotz zweier weiterer, im N-Terminus des Proteins gelegener, klassischer SUMO-Akzeptorlysine keine artifizielle SUMOylierung auf (Abbildung 4.2 A rechts).

Neben der spezifischen Modifikation und Präzipitation von transient überexprimiertem Sp3 wurden auch die vier mit 6xHis-SUMO konjugierten Isoformen von endogenem Sp3 angereichert (Abbildung 4.2 B). Hierbei trat in Übereinstimmung mit der Situation *in vivo* eine präferentielle Konjugation von 6xHis-SUMO2 auf.

L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β und ESET werden mit SUMO modifiziert

Nach Gewährleistung der Spezifität der SUMOylierung wurden die Sp3-SUMO-abhängigen Korepressoren L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β sowie ESET, das murine Homolog der humanen Histonmethyltransferase SETDB1, auf eine mögliche Modifikation mit SUMO hin untersucht (Abbildung 4.3). Eine zuvor durchgeführte Analyse der entsprechenden Aminosäuresequenzen identifizierte für alle fünf Proteine zahlreiche Lysinreste innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen.

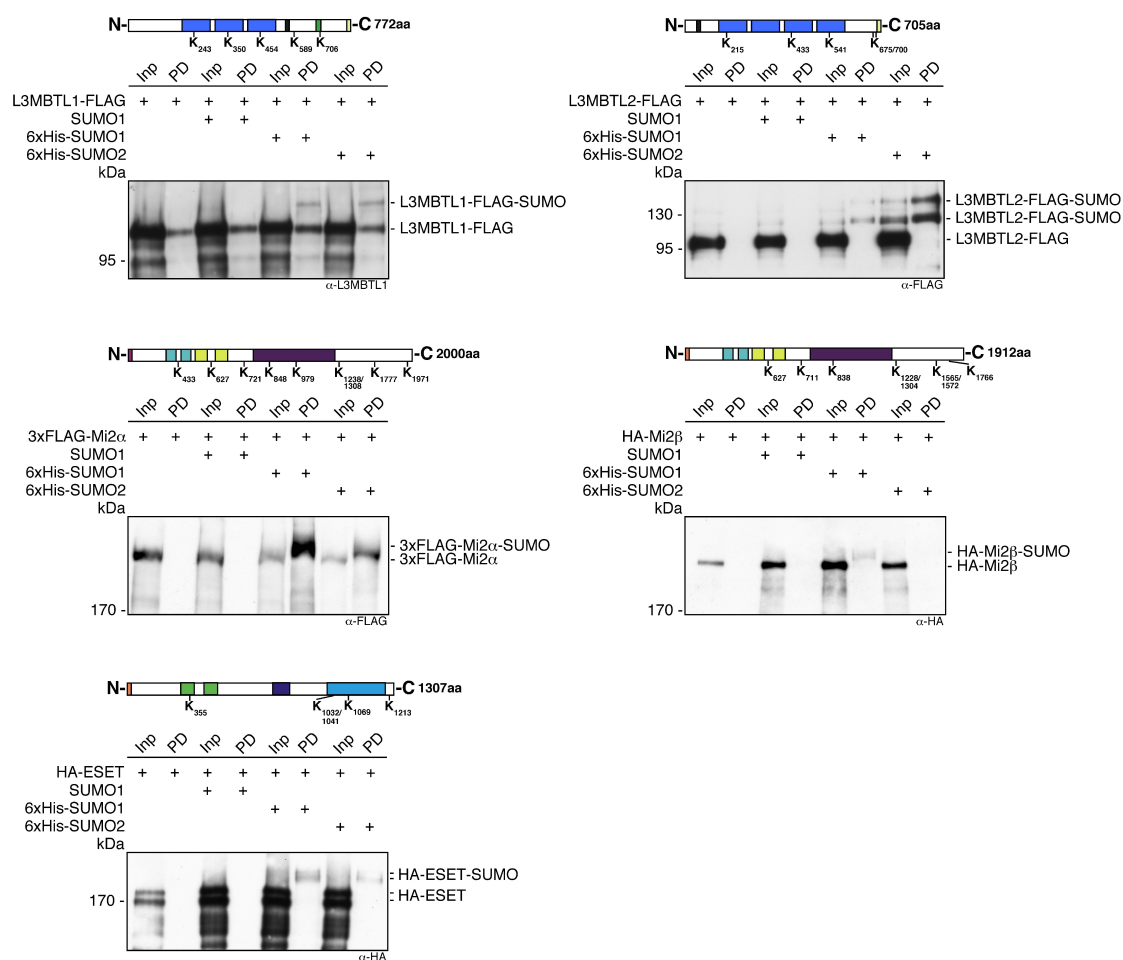


Abbildung 4.3: Sp3-abhängige Korepressoren werden mit 6xHis-SUMO modifiziert

HEK-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit 3 µg pCMV-tag4A-L3MBTL1, pCMV-tag4A-L3MBTL2, pCI-neoB-3xFLAG-Mi2α, pcDNA3-HA-Mi-2β oder pcDNA3-HA-ESETfl bzw. je 1,5 µg der für die Korepressoren kodierenden Konstrukte zusammen mit je 1,5 µg pSG-SUMO1, pSG-His-SUMO1 oder pSG-His-SUMO2 transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 4.2 A beschrieben. Die Immundetektion erfolgte mithilfe von α-FLAG, α-L3MBTL1 und α-HA Antikörpern. Input L3MBTL2, L3MBTL1, Mi-2α: 10%, Input Mi-2β, ESET: 25%

Proteinschemata L3MBTL2, L3MBTL1: MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), SPM-Domäne (grün), FLAG-Tag (gelb); Mi-2α, Mi-2β: PHD-Domänen (türkis), Chromo-Domänen (gelb), Helikase-Domäne (violett), 3xFLAG-Tag (pink), HA-Tag (orange); ESET: Tudor-Domänen (grün), MBD-Domäne (dunkelblau), SET-Domäne (hellblau), HA-Tag (orange); K: Lysine innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen

Der Nickel-Pulldown von L3MBTL1 zeigte im Vergleich zum unmodifizierten Protein eine höher molekulare Proteinbande nach Koexpression von 6xHis-SUMO. Dabei war jedoch keine Präferenz für die Konjugation einer der beiden SUMO-

Isoformen feststellbar. Die vergleichsweise starke Bindung von unmodifiziertem L3MBTL1 an die Matrix ist vermutlich auf zwei mehrfach direkt aufeinander folgende Histidinreste in der Aminosäuresequenz von L3MBTL1 zurückzuführen. In weiterführenden Experimenten wurde die Bindung von unmodifiziertem L3MBTL1 durch stringendere Bindungsbedingungen verringert (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung einer möglichen SUMOylierung von L3MBTL2 ergab eine deutliche Modifikation des Proteins in Form zweier Banden höheren Molekulargewichts. Beide Banden waren bereits vor der Anreicherung 6xHis-SUMO-modifizierter Proteine schwach sichtbar. Eine Unterscheidung zwischen einer einfachen SUMOylierung zweier Lysinreste und einer mehrfachen Modifikation desselben Akzeptorlysins ist an dieser Stelle jedoch nicht möglich. Neben der generellen Identifizierung SUMO-modifizierter Formen von L3MBTL2 wurde eine klare Präferenz für die Konjugation von 6xHis-SUMO2 festgestellt.

Im Fall von Mi-2 α waren nach Nickel-Pulldown wie bereits für L3MBTL1 und L3MBTL2 spezifisch mit 6xHis-SUMO-modifizierte Formen des Proteins nachweisbar. In diesem Fall trat eine bevorzugte Konjugation von 6xHis-SUMO1 auf. Da bereits unmodifiziertes Mi-2 α ein Molekulargewicht von 227 kDa besitzt, konnte hier keine Auftrennung verschiedener SUMO-modifizierter Formen erreicht werden. Dennoch ist aufgrund der relativ breiten Verteilung des Signals von einer mehrfachen Modifikation des Proteins auszugehen.

Die Analyse einer möglichen SUMOylierung von Mi-2 β zeigte eine sehr schwache Proteinbande höheren Molekulargewichts nach Koexpression von 6xHis-SUMO1. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde bereits für *in vitro* transkribiertes und translatiertes Mi-2 β die Konjugation von SUMO1 im Rahmen einer *in vitro* SUMOylierung beschrieben (Gocke et al., 2005).

Die Untersuchung der murinen Histonmethyltransferase ESET führte ebenfalls zur Identifizierung mit 6xHis-SUMO1 und 6xHis-SUMO2 konjugierter Formen des Proteins. Da ESET in mehreren Isoformen exprimiert wird, von denen sich die beiden größten in ihrem Molekulargewicht kaum unterscheiden, kann bei der hier aufgetretenen Doppelbande nicht zwischen einer einfachen SUMOylierung beider Isoformen oder der mehrfachen Modifikation einer Isoform unterschieden werden. Die generelle Beobachtung der mehrfachen SUMOylierung von ESET stimmt jedoch mit publizierten Daten überein. Dabei führte die Koexpression von ESET und

SUMO1 ebenfalls zum Nachweis mehrerer mit SUMO1-modifizierter Formen von ESET (Yeap et al., 2009).

Zusammenfassend wurden L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β sowie ESET mithilfe der Nickel-Affinitätschromatographie als Substrate der SUMOylierung identifiziert.

4.1.3 Nachweis der SUMOylierung von endogenem L3MBTL2 mit SUMO2/3

Die Untersuchung Sp3-abhängig rekrutierter Korepressoren im Hinblick auf eine SUMOylierung ergab, dass sowohl L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β als auch ESET selbst SUMOyliert sind (Abbildung 4.3). Ein besonders deutliches Ergebnis zeigte sich dabei für das MBT-Domänen Protein L3MBTL2. Die SUMOylierten Formen von L3MBTL2 waren bereits im Gesamtzellextrakt nachweisbar und wurden im Fall von 6xHis-SUMO2 mithilfe der Affinitätschromatographie stark angereichert. Da es sich in diesem Versuch um transient überexprimiertes L3MBTL2 handelte, wurde im Folgenden untersucht, ob die Modifikation mit SUMO auch für endogenes L3MBTL2 nachweisbar war. Dazu wurde ein Nickel-Pulldown mit Gesamtzellextrakten aus stabil mit 6xHis-SUMO1, 6xHis-SUMO2 bzw. 6xHis-SUMO3 transfizierten HeLa-Zellen (Tatham et al., 2009) durchgeführt und endogenes L3MBTL2 auf eine SUMOylierung hin untersucht. Abbildung 4.4 A zeigt eine deutliche Modifikation des endogenen Proteins mit 6xHistidin-Fusionen jeder der drei SUMO-Isoformen. Auch hier war eine deutliche Präferenz für die Konjugation von 6xHis-SUMO2 gegenüber 6xHis-SUMO3 und dem etwas schwächer exprimierten 6xHis-SUMO1 erkennbar. Eine weitere Bestätigung der SUMOylierung von endogenem L3MBTL2 lieferte die Depletion von L3MBTL2. Zur Kontrolle der Depletion wurden SDS-Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die durch einen L3MBTL2-spezifischen Erstantikörper sowie einen Fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper erhaltenen Signale mithilfe des LICOR Odyssey analysiert (Abbildung 4.4 B). Die Immundetektion zeigte neben einer Proteinbande auf Höhe des für L3MBTL2 erwarteten Molekulargewichts zwei weitere höher molekulare Banden. Die Quantitierung der einzelnen Signale ergab, dass jede der drei Banden infolge der Depletion von L3MBTL2 zwischen 60 und 70% ihrer Intensität verlor. Gleichmaßen zeigte die Quantitierung der Signale, dass die beiden höher

molekularen Banden zusammengenommen nahezu die gleiche Signalstärke wie unmodifiziertes L3MBTL2 aufwiesen. Demzufolge ist ein außerordentlich großer Anteil von L3MBTL2 mit SUMO modifiziert.

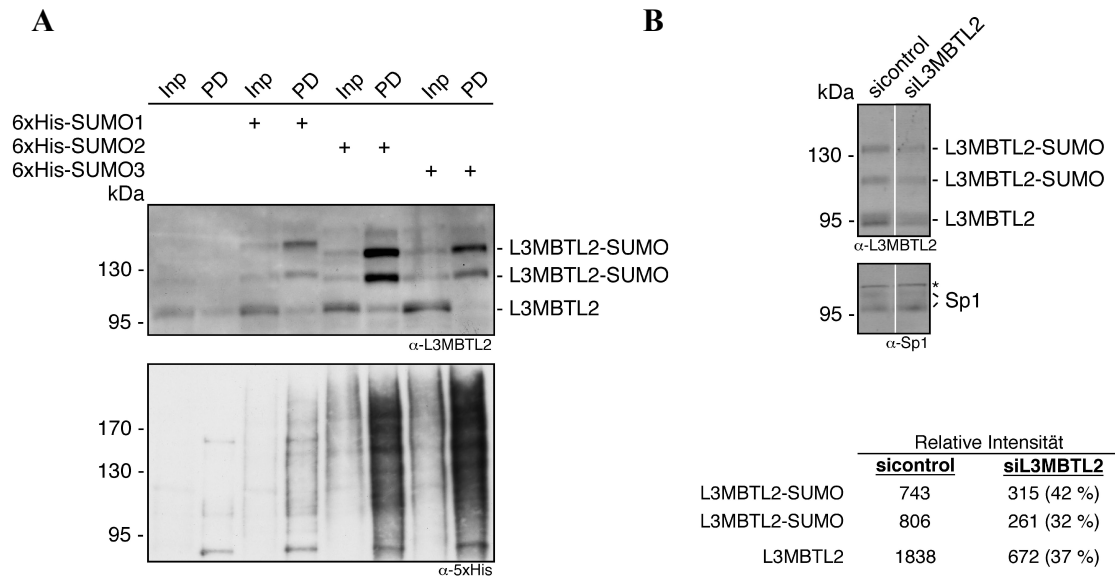


Abbildung 4.4: Endogenes L3MBTL2 wird mit SUMO modifiziert

A) Nickel-Pulldown zum Nachweis der SUMOylierung von endogenem L3MBTL2 Zur Analyse der SUMOylierung von endogenem L3MBTL2 wurden Gesamtzellextrakte von stabil mit 6xHis-SUMO1, -SUMO2 bzw. -SUMO3 transfizierten HeLa-Zellen unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Mit 6xHis-SUMO-modifizierte Proteine wurden durch Zugabe von je 20 µl magnetischer Nickel-NTA-Agarose über Nacht präzipitiert und durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer von den Beads gelöst und denaturiert. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel und der Nachweis von endogenem L3MBTL2 mithilfe eines α-L3MBTL2 Antikörpers. Input: 10% **B) Depletion von endogenem L3MBTL2** HEK-Zellen wurden in einer 96-well Platte mit 10 pmol einer Kontroll-siRNA bzw. 10 pmol eines Pools aus vier spezifischen siRNAs gegen L3MBTL2 mithilfe von Dharmafect Duo transfiziert. Nach sechs Tagen wurden SDS-Gesamtzellextrakte hergestellt und je 10 µg Protein in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen L3MBTL2 und Sp1. Als Zweitantikörper diente ein α-rabbit Alexa Fluor 680 Antikörper dessen Fluoreszenzsignal mithilfe des LICOR Odyssey detektiert und quantitiert wurde. Die Tabelle zeigt die Intensitäten der für die drei Banden von L3MBTL2 erhaltenen Fluoreszenzsignale der Kontrolldepletion sowie nach Depletion von L3MBTL2. Die Absolutwerte der Fluoreszenzen wurden auf die für Sp1 erhaltenen Signale normalisiert (Relative Intensität). In Klammern angegeben ist die Signalstärke der drei Banden nach Depletion von L3MBTL2 in Prozent im Vergleich zur Kontrolldepletion. * unspezifische Bande

Da die Modifikation von endogenem L3MBTL2 nach Überexpression von 6xHis-SUMO mit jeder der drei Isoformen erfolgte, wurde untersucht mit welcher Isoform endogenes L3MBTL2 *in vivo* modifiziert wird. Als Grundlage dafür diente die bereits in Kapitel 4.1.1 beschriebene transiente Depletion von SUMO1 bzw. SUMO2/3 in HEK-Zellen mittels RNA-Interferenz. Die Immundetektion von endogenem L3MBTL2 zeigte, dass nur der spezifische Knockdown von SUMO2/3 zu einem nahezu vollständigen Verlust der SUMOylierten Formen des Proteins führte. L3MBTL2 wird somit wie auch Sp3 *in vivo* mit SUMO2/3 modifiziert (Abbildung 4.5).

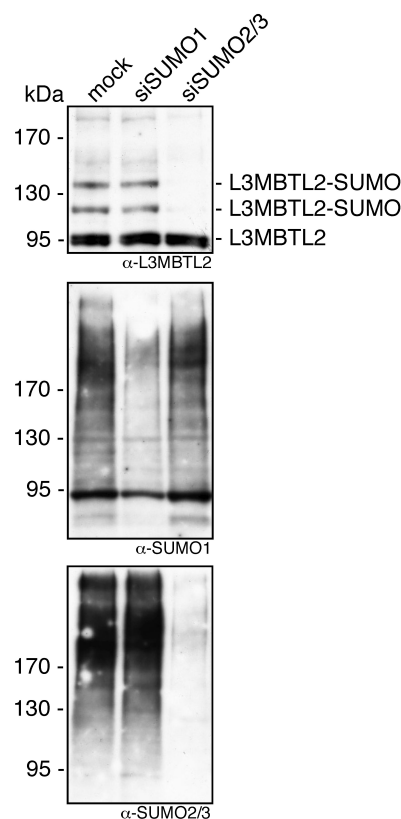


Abbildung 4.5: L3MBTL2 wird *in vivo* mit SUMO2/3 modifiziert

Die transiente Depletion von SUMO1 bzw. SUMO2/3 erfolgte wie in Abbildung 4.1 A beschrieben. 20 μ g Protein wurde mithilfe eines 6%-igen SDS-PAA-Gels aufgetrennt und nach Western Blotting mit α -L3MBTL2, α -SUMO1 bzw. α -SUMO2/3 Antikörpern analysiert. Ein unspezifischer Effekt des Leervektors pTer auf die Expression von SUMO2/3 wurde bereits ausgeschlossen (Abbildung 4.1 B).

4.1.4 Identifizierung der SUMO-Akzeptor-Lysine in L3MBTL2

L3MBTL2 wurde als Ziel der posttranslationalen Modifikation mit SUMO identifiziert. Um die funktionale Relevanz dieser Modifikation zu untersuchen, wurden die SUMO-Akzeptor-Lysine von L3MBTL2 ermittelt. Durch Mutation der entsprechenden Aminosäuren wurde daraufhin eine SUMOylierungs-defiziente Mutante des Proteins generiert. Dazu wurde die für L3MBTL2 kodierende cDNA in einem ersten Schritt unter Berücksichtigung der funktionellen Domänen des Proteins in drei Abschnitte unterteilt. Jedes der entstehenden Fragmente enthielt mindestens einen Lysinrest innerhalb einer klassischen SUMO-Konsensus-Sequenz. Die Fragmente wurden als 3xFLAG-Fusionsproteine in HEK-Zellen exprimiert und der jeweilige SUMOylierungsstatus mithilfe des Nickel-Pulldowns untersucht (Abbildung 4.6). Aufgrund der *in vivo* nachgewiesenen Modifikation von L3MBTL2 mit SUMO2/3 wurde auf die Koexpression von 6xHis-SUMO1 verzichtet. Wie Abbildung 4.6 zeigt, wurden alle drei Fragmente auf einem vergleichbaren Niveau exprimiert. Nach Koexpression von 6xHis-SUMO2 wurde für das N- und C-terminale Fragment von L3MBTL2 eine deutliche Konjugation von SUMO nachgewiesen. Im Fall des mittleren Fragments konnte anhand dieses Experiments keine klare Aussage über eine Modifikation mit SUMO getroffen werden. Zwar traten nach Koexpression von 6xHis-SUMO2 Banden höheren Molekulargewichts auf, jedoch unterschieden sich diese in ihrer Intensität stark von den für die beiden anderen Fragmente erhaltenen Signalen. Aus diesem Grund konzentrierte sich die weitere Analyse der SUMO-Akzeptor-Stellen auf das N- und C-terminale Fragment von L3MBTL2.

Um zu untersuchen, ob innerhalb des N- und C-terminalen Fragments Lysinreste im Kontext klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen als Akzeptorstellen für die Konjugation von SUMO dienen, wurden die Lysinreste 215, 541, 675 und 700 mithilfe einer PCR-basierten gerichteten Einzelmутagenese durch Argininreste ersetzt (Abbildung 4.7 A links). Von besonderem Interesse war hierbei das potentielle Akzeptorlysin an Position 541 innerhalb der vierten MBT-Domäne von L3MBTL2. Diese vermittelt im Verbund der vier MBT-Domänen die Bindung an methylierte Histone (Guo et al., 2009; Yoo et al., 2010), so dass eine mögliche SUMOylierung Einfluss auf die Histonbindung nehmen könnte. Zur Analyse des SUMOylierungsstatus der vier Einzelmутanten wurden die Fragmente als 3xFLAG-Fusionsproteine zusammen mit 6xHis-SUMO2 in HEK-Zellen exprimiert und nach

anschließendem Nickel-Pulldown auf ihre Modifikation hin untersucht (Abbildung 4.7). Als Negativkontrolle diente die Koexpression von SUMO1.

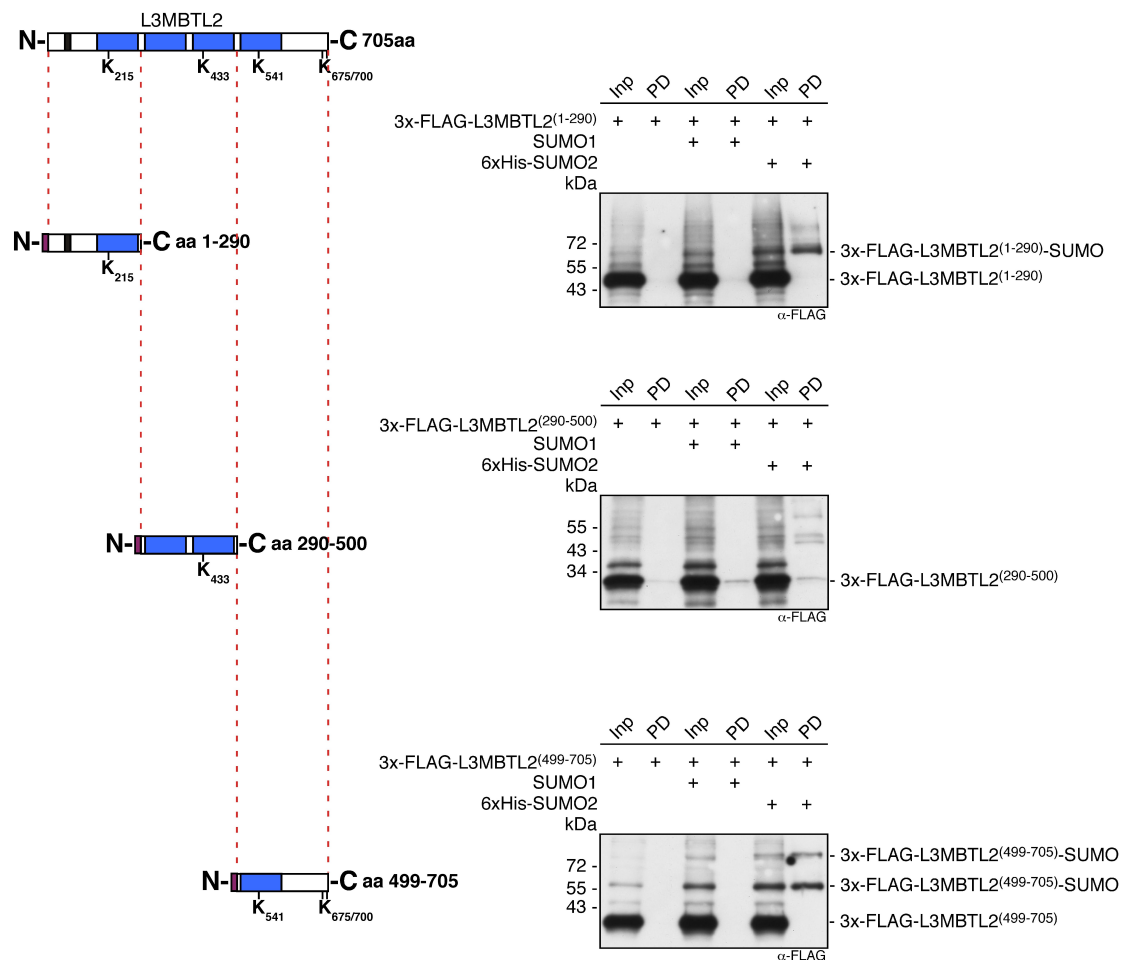


Abbildung 4.6: Eingrenzung der SUMO-Akzeptorstellen in L3MBTL2

Schematische Darstellung der generierten Fragmente von L3MBTL2 (Links) Um Fragmente von L3MBTL2 auf ihre SUMOylierung hin untersuchen zu können, wurde das volle Länge Protein in drei Abschnitte unterteilt. Die entsprechenden DNA-Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template diente der Vektor pCMV-tag4A-L3MBTL2. Die PCR-Produkte wurden in den ebenfalls für diese Arbeit hergestellten Vektor pN3-3xFLAG kloniert. **Proteinschemata** MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), 3xFLAG-Tag (pink); K: Lysine innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen **Nickel-Pulldown mit Fragmenten von L3MBTL2 (rechts)** Der Nickel-Pulldown wurde wie unter Abbildung 4.2 A beschrieben durchgeführt, wobei anstelle der Expressionskonstrukte für Sp3 die Transfektion mit pN3-3xFLAG-N-TerminusL2, pN3-3xFLAG-mittlerersFragmentL2 bzw. pN3-3xFLAG-C-TerminusL2 erfolgte. Präzipitierte Proteine wurden in 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und nach Western Blotting mit einem α-FLAG Antikörper detektiert. Input: 10%

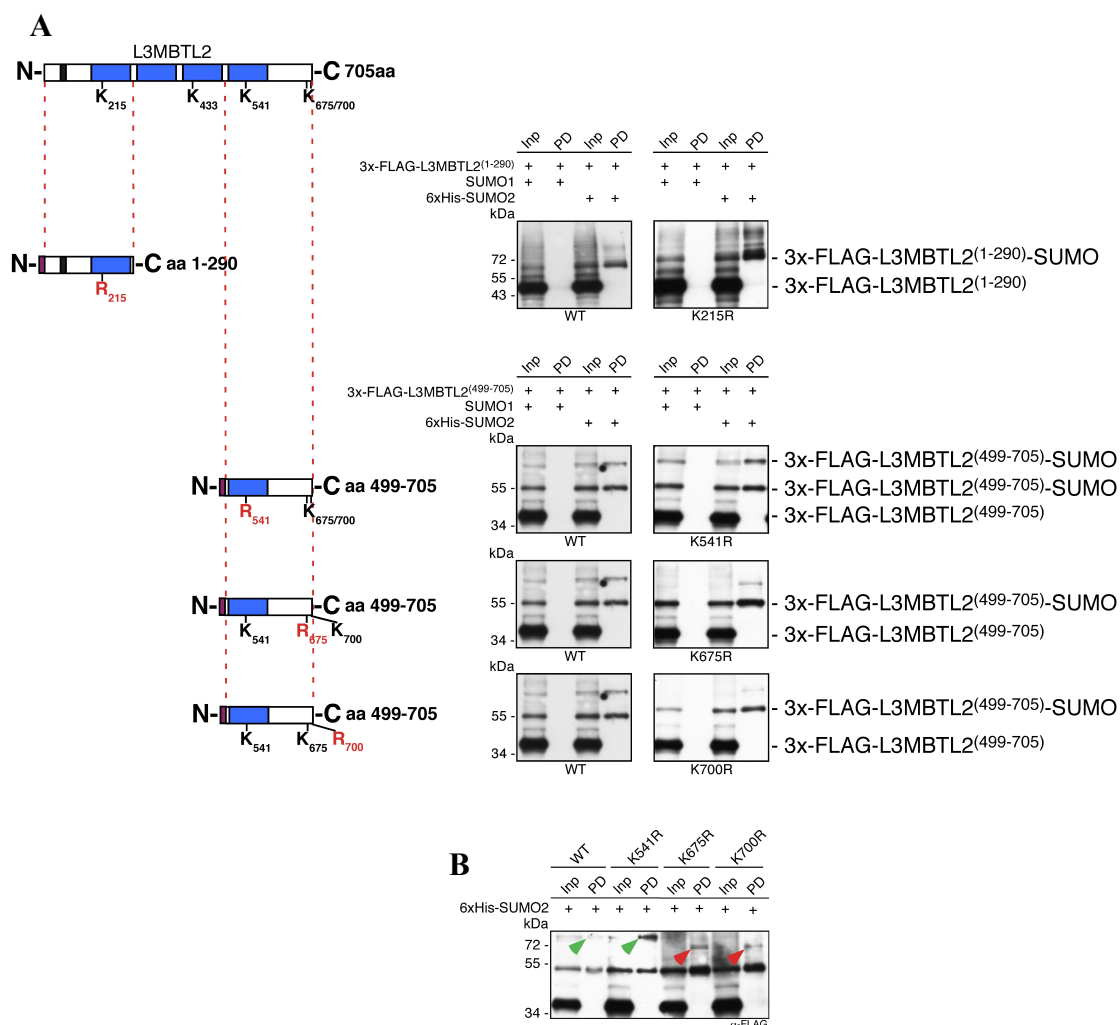


Abbildung 4.7: Analyse klassischer SUMO-Akzeptor-Lysine im N- und C-terminalen Fragment von L3MBTL2

A) Schematische Darstellung der mutierten Lysinreste im N- und C-terminalen Fragment von L3MBTL2 (Links) Die vier im N- und C-terminalen Fragment von L3MBTL2 befindlichen Lysinreste innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen wurden auf DNA-Ebene mithilfe einer PCR-basierten gerichteten Einzelmутagenese gegen Argininreste ausgetauscht. Als Template der PCR dienten die Vektoren pN3-3xFLAG-N-TerminusL2 bzw. pN3-3xFLAG-C-TerminusL2. **Proteinschemata** MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), 3xFLAG-Tag (pink); K: Lysine innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen; R: zu Arginin mutierte Lysinreste innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen **Nickel-Pulldown mit mutierten Fragmenten von L3MBTL2 (rechts)** Zur Untersuchung potentieller SUMO-Akzeptorstellen im N- und C-terminalen Fragment von L3MBTL2 wurden HEK-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen mit je 1,5 µg pN3-3xF-N-TermL2-K215R, pN3-3xF-C-TermL2-K541R, pN3-3xF-C-TermL2-K675R bzw. pN3-3xF-C-TermL2-K700R zusammen mit je 1,5 µg pSG-SUMO1 oder pSG-His-SUMO2 transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie unter Abbildung 4.2 A beschrieben. Präzipitierte Proteine wurden

in 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und nach Western Blotting mit einem α -FLAG Antikörper detektiert. Input: 10% **B)** Zum direkten Vergleich des Molekulargewichts der mit 6xHis-SUMO2-modifizierten Einzelmutanten des C-terminalen mit dem wildtypischen Fragment von L3MBTL2 wurden die affinitätsgereinigten Proben gemeinsam auf einem 12%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mit einem α -FLAG Antikörper detektiert. Grüne Pfeile: höher molekulare SUMOylierte Form des C-Terminus von 3xFLAG-L3MBTL2, rote Pfeile: nach Verlust der höher molekularen SUMOylierten Form des C-Terminus von 3xFLAG-L3MBTL2 aufgetretene Bande. Input: 10%

Aus Abbildung 4.7 A geht hervor, dass jede der vier Einzelmutanten weiterhin mit 6xHis-SUMO2 modifiziert wurde. Ein Vergleich der SUMOylierten Einzelmutanten des C-terminalen Fragments mit dem wildtypischen Fragment zeigte jedoch, dass nach Mutation der Lysinreste 675 und 700 die SUMOylierte Form höheren Molekulargewichts durch eine Bande deutlich schwächerer Intensität und geringeren Molekulargewichts ersetzt wurde. Zur Verdeutlichung dieses Effekts wurden die mit 6xHis-SUMO2-modifizierten aufgereinigten Proben der drei Einzelmutanten mit der des wildtypischen Fragments in einem gemeinsamen SDS-Gel aufgetrennt und analysiert (Abbildung 4.7 B).

Da sowohl Lysin 675 als auch Lysin 700 Einfluss auf den SUMOylierungsstatus des C-terminalen Fragments von L3MBTL2 nahmen, wurden beide Aminosäuren gleichzeitig mittels PCR-basierter gerichteter Multimutagenese mutiert (Abbildung 4.8 A links). Der anschließende Nickel-Pulldown zeigte, dass nach Mutation beider Lysinreste nur noch eine einfache Modifikation des Fragments mit 6xHis-SUMO2 stattfindet. Gleichzeitig war der Anteil des einfach modifizierten Proteinfragments im Vergleich zur wildtypischen Situation wesentlich geringer. Aufgrund dieser Rest-SUMOylierung wurde auch Lysin 541 im C-terminalen Fragment mithilfe einer weiteren Mutagenese durch Arginin ersetzt. Die SUMOylierung der Dreifachmutante wurde dann im Nickel-Pulldown untersucht. Aus Abbildung 4.8 A (rechts) geht hervor, dass die zusätzliche Mutation von Lysin 541 keine Veränderung der SUMOylierung des Proteinfragments hervorruft. Daher kann Lysin 541 als Akzeptorstelle der SUMOylierung sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

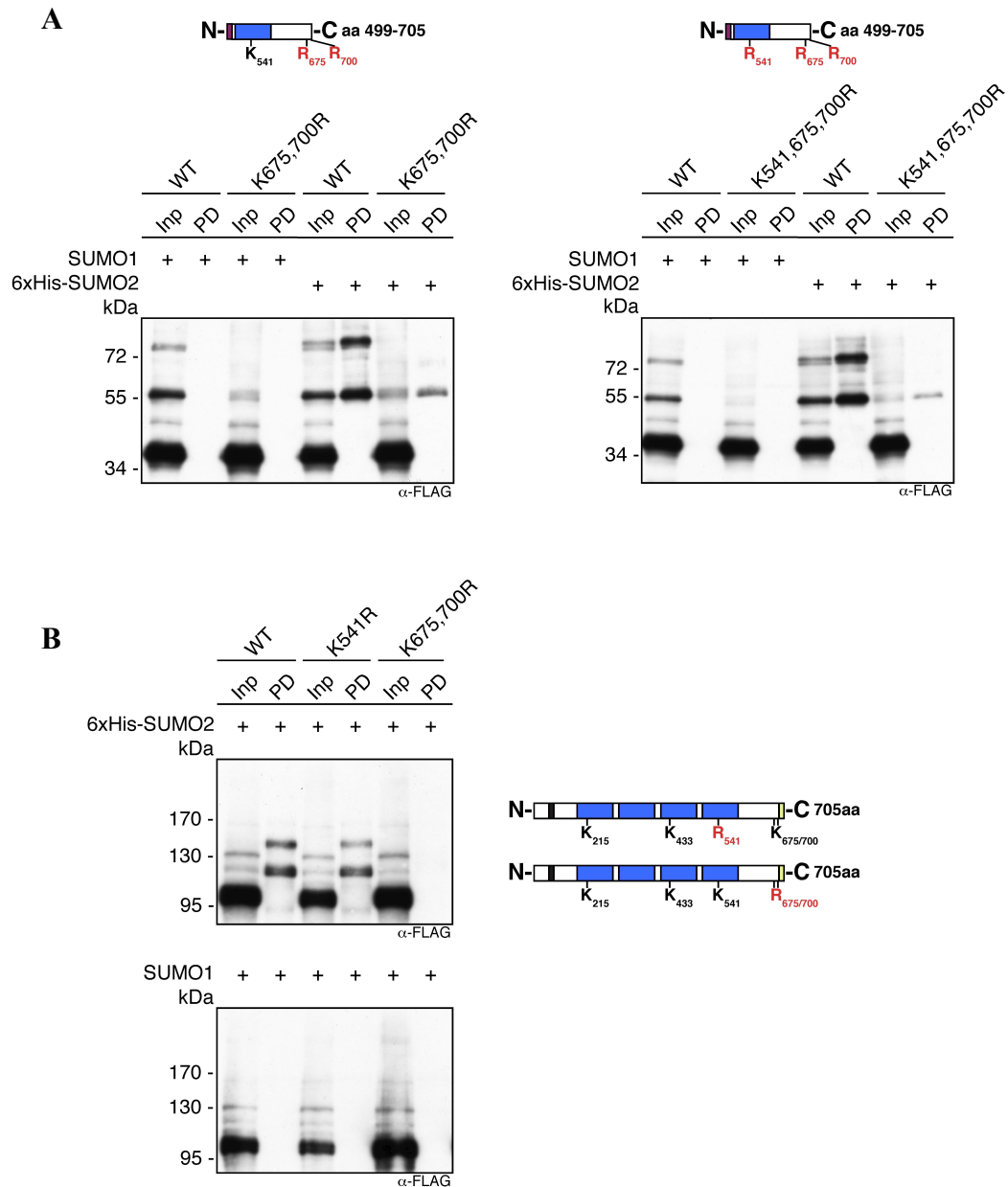


Abbildung 4.8: Identifizierung der SUMO-Akzeptor-Lysine im C-Terminus von L3MBTL2

A) Nickel-Pulldown der Doppel- und Dreifachmutante des C-terminalen Fragments von L3MBTL2 Mithilfe einer PCR-basierten gezielten Multimutagenese wurden auf Ebene der für das Fragment kodierenden DNA-Sequenz die Lysine 675 und 700 gegen Argininreste ausgetauscht. Als Template der PCR diente der Vektor pN3-3xFLAG-C-TerminusL2. Zur Herstellung der Dreifachmutante erfolgte eine weitere Einzelmutagenese des Lysinrests 541, wobei das Konstrukt der Doppelmutante als Template diente. Zur Untersuchung der SUMOylierung beider mutierten Fragmente wurden HEK-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen mit je 1,5 µg pN3-3xF-C-TermL2-K675,700R (links) bzw. pN3-3xF-L2C-Term-K541,675,700R (rechts) zusammen mit je 1,5 µg pSG-SUMO1 oder pSG-His-SUMO2 transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie unter Abbildung 4.2 A beschrieben. Präzipitierte Proteine wurden in 12%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und nach

Western Blotting mit einem α -FLAG Antikörper detektiert. Input: 10% **B) Identifizierung der SUMO-Akzeptor-Lysine von volle Länge L3MBTL2** Mithilfe einer PCR-basierten gezielten Multimutagenese wurden auf Ebene der für L3MBTL2 kodierenden DNA-Sequenz Lysin 541 bzw. die Lysine 675 und 700 durch Argininreste ersetzt. Als Template der PCR diente der Vektor pCMV-tag4A-L3MBTL2. Zur Untersuchung der SUMOylierung des volle Länge Proteins wurden HEK-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen mit je 1,5 μ g pCMV-tag4A-L3MBTL2, pCMV-tag4A-L2fK541R bzw. pCMV-tag4A-L2fK675,700R zusammen mit je 1,5 μ g pSG-SUMO1 oder pSG-His-SUMO2 transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie unter Abbildung 4.2 A beschrieben. Präzipitierte Proteine wurden in 6%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und nach Western Blotting mit einem α -FLAG Antikörper detektiert. Input: 10%

Proteinschemata MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), 3xFLAG-Tag (pink), FLAG-Tag (gelb); K: Lysine innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen; R: zu Arginin mutierte Lysinreste innerhalb klassischer SUMO-Konsensus-Sequenzen

Als Grundlage der bisherigen Experimente zur Identifizierung der SUMO-Akzeptor-Lysine von L3MBTL2 dienten Fragmente des Proteins. Dabei wies sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Fragment von L3MBTL2 eine deutliche SUMOylierung auf. Jedoch zeigte nur die Mutation der Lysinreste 675 und 700 im C-terminalen Fragment einen Effekt auf die SUMOylierung. Um eine artifizielle SUMOylierung als Folge einer unvollständigen Faltung der Fragmente auszuschließen, wurden die Lysine 675 und 700 auch im Kontext des volle Länge Proteins untersucht. Beide Lysinreste wurden dafür auf Ebene der für volle Länge L3MBTL2 kodierenden DNA-Sequenz gegen Arginine ausgetauscht. Als Negativkontrolle erfolgte eine unabhängige Mutation des Lysinrests 541, da dieser im Kontext des Fragments nicht mit SUMO modifiziert wurde. Nach Koexpression von 6xHis-SUMO2 wurde der SUMOylierungsstatus der beiden als FLAG-Fusionsproteine exprimierten Mutanten im Nickel-Pulldown analysiert (Abbildung 4.8 B). Als Negativkontrolle diente wiederum die Koexpression von SUMO1. Der Vergleich mit dem SUMOylierten wildtypischen Protein zeigt, dass Lysin 541 wie bereits im Kontext des C-terminalen Fragments keine Rolle für die SUMOylierung von L3MBTL2 spielt. Im Gegensatz dazu führte die gleichzeitige Mutation der Lysinreste 675 und 700, anders als im Fall des C-terminalen Fragments, zum vollständigen Verlust der SUMOylierung von volle Länge L3MBTL2. Im Bereich des N-Terminus von volle Länge L3MBTL2 fand somit, entgegen der Analyse der Fragmente, keine SUMOylierung statt.

Mithilfe der Mutationsanalysen wurden die Lysine 675 und 700 am äußersten C-Terminus von L3MBTL2 als die beiden SUMO-Akzeptor-Stellen von L3MBTL2 identifiziert. Gleichzeitig wurde eine SUMOylierungs-defiziente Mutante zur funktionalen Analyse der L3MBTL2 SUMOylierung generiert.

4.1.5 *In vitro* SUMOylierung von L3MBTL2

Neben den Untersuchungen zur SUMOylierung von nativem und transient überexprimiertem L3MBTL2 wurde analysiert, ob das rekombinante Protein *in vitro* mit SUMO modifiziert werden kann und die Konjugation spezifisch an den für volle Länge L3MBTL2 identifizierten Lysinresten erfolgt. Dazu wurde volle Länge L3MBTL2 als 6xHis-Fusionsprotein in *E.coli* BL21 Zellen exprimiert und mithilfe einer Nickel-Affinitätsmatrix aufgereinigt. Der Reaktionsansatz für die *in vitro* SUMOylierung beinhaltete neben rekombinantem 6xHis-L3MBTL2 das heterodimere E1-Enzym 6xHis-AOS1/UBA2, das E2-Enzym UBC9 sowie SUMO1 oder SUMO2. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ATP gestartet. Als Negativkontrolle verblieb je ein Ansatz ohne ATP. Zur Verfolgung der Reaktionskinetik wurden aus allen Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und im Western Blot analysiert (Abbildung 4.9 A). Wie aus Abbildung 4.9 A hervorgeht, konnte rekombinantes L3MBTL2 *in vitro* mit SUMO1 und SUMO2 modifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Analyse des nativen und transient überexprimierten Proteins war dabei eine deutliche Präferenz für die Konjugation von SUMO2 erkennbar. Die *in vitro* SUMOylierung mit SUMO1 zeigte nach 60 Minuten zwei höhermolekulare Banden, die den SUMO-modifizierten Formen von L3MBTL2 entsprachen. Nach 90 Minuten lagen das unmodifizierte sowie jede der beiden mit SUMO1 konjugierten Formen zu gleichen Teilen vor. Im Fall der Modifikation mit SUMO2 waren die beiden *in vivo* auftretenden SUMOylierten Formen von L3MBTL2 bereits nach 30 Minuten nachweisbar. Die weitere Verlängerung der Reaktionszeit führte zu einer fortschreitenden PolySUMOylierung des Proteins, so dass nach 90 Minuten kaum mehr unmodifiziertes L3MBTL2 detektierbar war.

Für die effiziente und spezifische SUMOylierung eines Proteins spielen neben dem aktivierenden E1- und dem konjugierenden E2-Enzym E3-Ligasen eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde ein möglicher Effekt der E3-Ligase PIAS1 auf die SUMOylierung von L3MBTL2 untersucht. Hierfür wurde dem zuvor beschriebenen

Reaktionsansatz aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen aufgereinigtes 6xHis-PIAS1 zugesetzt und die Kinetik der Reaktion mittels Western Blotting verfolgt.

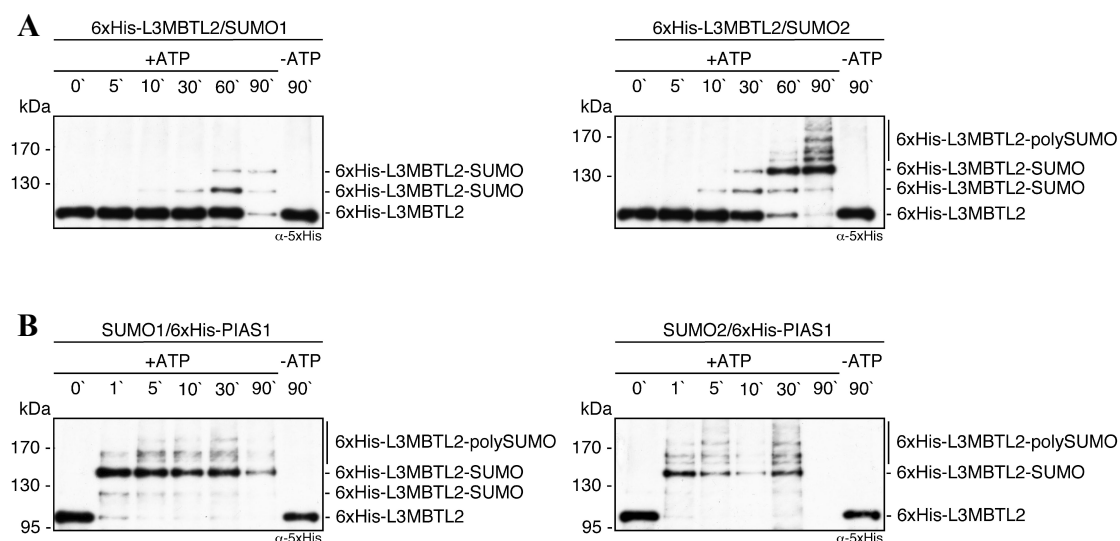


Abbildung 4.9: Rekombinantes L3MBTL2 kann *in vitro* mit SUMO modifiziert werden

A) *In vitro* SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 mit SUMO1 und SUMO2 Zur *in vitro* SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 wurden 7 µg des aufgereinigten rekombinanten Proteins zusammen mit 1,5 ng/µl 6xHis-AOS1/UBA2, 2,5 ng/µl UBC9 und 5 ng/µl SUMO1 oder SUMO2 in einem Gesamtvolumen von 70 µl bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne ATP. Zur Verfolgung der Reaktionskinetik wurden aus allen vier Ansätzen zum Zeitpunkt der ATP-Zugabe sowie 5, 10, 30, 60 und 90 min nach Start der Reaktion 10 µl entnommen, mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und nach Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA Gel im Western Blot mithilfe eines α-5xHis Antikörpers analysiert. Die nach 90 min generell schwächeren Signale der *in vitro* SUMOylierung mit SUMO1 sind vermutlich auf ein unzureichendes Durchmischen nach Zentrifugation des Reaktionsansatzes vor der Probenentnahme zurückzuführen. **B) PIAS1 wirkt als E3-Ligase bei der SUMOylierung von L3MBTL2 *in vitro*** Zur Untersuchung des Effekts von PIAS1 auf die *in vitro* SUMOylierung von L3MBTL2 wurde den in A) beschriebenen Reaktionsansätzen aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen gewonnenes, aufgereinigtes 6xHis-PIAS1 zugesetzt. Die eingesetzte Proteinmenge von PIAS1 wurde anhand eines Coomassie Gels abgeschätzt. Die Probenentnahme und -analyse erfolgte wie in A). Das nach 90 min fehlende Signal der *in vitro* SUMOylierung mit SUMO2 ist vermutlich auf ein unzureichendes Durchmischen nach Zentrifugation des Reaktionsansatzes vor der Probenentnahme zurückzuführen.

Abbildung 4.9 B zeigt, dass L3MBTL2 bereits nach einer Minute fast vollständig mit SUMO1 bzw. SUMO2 modifiziert war. Somit wurde PIAS1 *in vitro* als E3-Ligase der SUMOylierung von L3MBTL2 identifiziert. Im Gegensatz zur Reaktion ohne PIAS1 führte die Zugabe der E3-Ligase auch zur PolySUMOylierung mit SUMO1. Obwohl SUMO1 selbst keine klassische SUMO-Konsensus-Sequenz enthält, wurde die Ausbildung von PolySUMO1-Ketten *in vitro* bereits nachgewiesen (Yang et al., 2006a).

Nach der erfolgreichen SUMOylierung von rekombinantem L3MBTL2 wurde untersucht, ob auch *in vitro* die Lysinreste 675 und 700 als Akzeptorstellen der SUMOylierung dienen. Dazu wurde eine Mutante des rekombinanten volle Länge Proteins generiert, bei der die Lysine 675 und 700 gegen Arginine ausgetauscht wurden. Sowohl die Doppelmutante als auch wildtypisches L3MBTL2 wurde als 6xHistidin-Fusionsprotein in *E.coli* BL21 Zellen exprimiert und nach Aufreinigung mithilfe einer Nickel-Affinitätsmatrix in einem *in vitro* SUMOylierungs-Experiment eingesetzt (Abbildung 4.10 A). Da auch *in vitro* eine Präferenz für die Konjugation von SUMO2 feststellbar war, wurde auf die Analyse von SUMO1 verzichtet. Die *in vitro* SUMOylierung von wildtypischem L3MBTL2 mit SUMO2 zeigte den aus Abbildung 4.9 A bekannten Verlauf. Für die Doppelmutante konnten dagegen auch nach 90 Minuten keine SUMOylierten Formen nachgewiesen werden. Die fehlende SUMOylierung der Doppelmutante von L3MBTL2 belegt, dass auch *in vitro* die Lysine 675 und 700 als alleinige Akzeptorstellen der SUMOylierung dienen.

Um die Spezifität der *in vitro* SUMOylierung von L3MBTL2 auch unter dem Einfluss der E3-Ligase PIAS1 zu untersuchen, wurden das wildtypische Protein sowie die Doppelmutante zusammen mit 6xHis-PIAS1 in einem *in vitro* SUMOylierungs-Experiment mit SUMO2 eingesetzt (Abbildung 4.10 B). In Übereinstimmung mit Abbildung 4.9 B führte die Zugabe von 6xHis-PIAS1 zur einer deutlich beschleunigten und verstärkten SUMOylierung des wildtypischen Proteins. Im Fall der Doppelmutante von L3MBTL2 war auch in Gegenwart von 6xHis-PIAS1 keine SUMOylierung von L3MBTL2 nachweisbar. Somit wurden die Lysinreste 675 und 700 erneut als alleinige Akzeptorstellen der SUMOylierung von L3MBTL2 bestätigt.

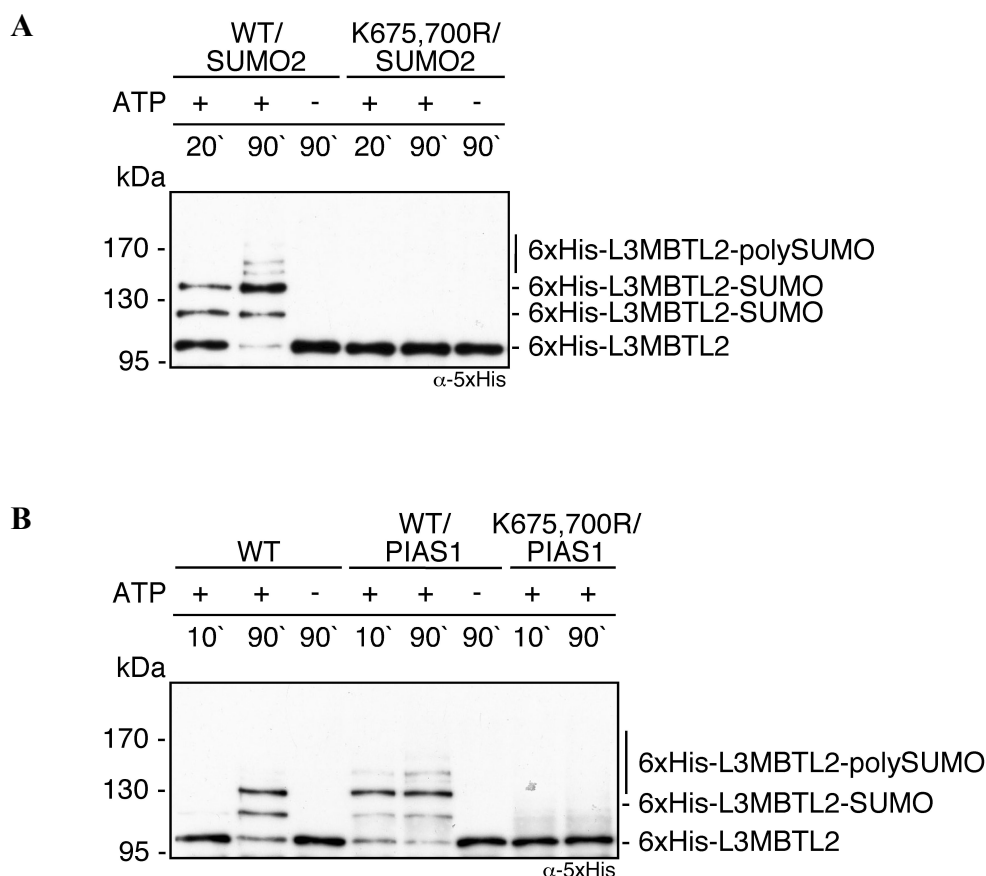


Abbildung 4.10: L3MBTL2 wird *in vitro* spezifisch an den Lysinen 675 und 700 SUMOyliert

A) 6xHis-L3MBTL2 wird auch *in vitro* an den *in vivo* identifizierten Lysinresten SUMOyliert Ca. 7 μ g von rekombinantem aufgereinigtem 6xHis-L3MBTL2 bzw. 6xHis-L3MBTL2-K675,700R wurden zusammen mit je 3 ng/ μ l 6xHis-AOS1/UBA2, 5 ng/ μ l UBC9 und 10 ng/ μ l SUMO2 in einem Gesamtvolumen von 20 μ l bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP gestartet. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne ATP. Zur Verfolgung der Reaktionskinetik wurden aus beiden Ansätzen 20 min und 90 min nach ATP-Zugabe 10 μ l des Reaktionsvolumens entnommen, mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und anschließend nach Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel im Western Blot mithilfe eines α -5xHis Antikörpers analysiert. **B) PIAS1 bewirkt keine artifizielle SUMOylierung von L3MBTL2 *in vitro*** Ca. 7 μ g von aufgereinigtem rekombinantem 6xHis-L3MBTL2 bzw. 6xHis-L3MBTL2-K675,700R wurden mit je 1,8 ng/ μ l 6xHis-AOS1/UBA2, 3 ng/ μ l UBC9, 6 ng/ μ l SUMO2 sowie aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen gewonnenem und aufgereinigtem 6xHis-PIAS1 in einem Gesamtvolumen von 20 μ l bei 37 °C inkubiert. Die eingesetzte Proteinmenge von PIAS1 wurde anhand eines Coomassie Gels abgeschätzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP gestartet. Als Negativkontrolle diente im Fall von wildtypischem L3MBTL2 je ein Ansatz ohne ATP. Zur Verfolgung der Reaktionskinetik erfolgte 10 bzw. 90 min nach ATP-Zugabe die Entnahme von je 10 μ l des Reaktionsvolumens zur Analyse im Western Blot mittels eines α -5xHis Antikörpers.

4.2 Analysen zur Funktion der SUMOylierung von L3MBTL2

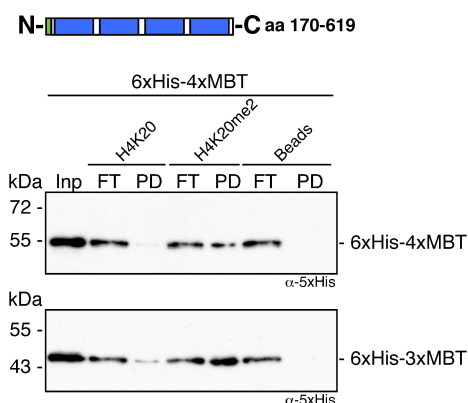
4.2.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens von L3MBTL2 gegenüber N-terminalen Histonenden

MBT-Domänen vermitteln die Bindung an methylierte Lysinreste innerhalb der N-Termini von Histonen (Maurer-Stroh et al., 2003; Wang et al., 2003). Für die isolierten MBT-Domänen von L3MBTL2 wurde eine selektive Bindung an H4K20me1 und H4K20me2 beschrieben (Guo et al., 2009). Darüber hinaus wurde die letzte der vier MBT-Domänen als die direkt mit dem Methylrest Interagierende identifiziert (Guo et al., 2009). Auch volle Länge L3MBTL2 wies eine Spezifität für die Bindung methylierter Peptide auf (Yoo et al., 2010). Basierend auf diesen Daten wurde im Folgenden die Bindungsaffinität von L3MBTL2 sowie deren Selektivität gegenüber methylierten N-terminalen Histonenden im Hinblick auf den Einfluss der SUMOylierung von L3MBTL2 untersucht.

4.2.1.1 Rekombinantes L3MBTL2 bindet an den unmodifizierten N-Terminus von Histon H4

Um die Bindung von rekombinantem L3MBTL2 an methylierte Histone zu untersuchen, wurden Peptid-Bindungsstudien mit dem N-Terminus von Histon H4 (Peptid-Pulldown) durchgeführt. Dazu wurden volle Länge L3MBTL2 (6xHis-L3MBTL2) sowie die vier MBT-Domänen von L3MBTL2 (6xHis-4xMBT) als 6xHis-Fusionsproteine in *E.coli* BL21 Zellen exprimiert und durch eine Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden dann mit immobilisierten H4K20- bzw. H4K20me2-Peptiden inkubiert und die Bindung durch Western Blotting analysiert. Als Positivkontrolle dienten die rekombinanten drei MBT-Domänen von L3MBTL1 (6xHis-3xMBT), welche in Peptid-Bindungsstudien selektiv an mono- und dimethylierte H4K20- und H1bK26-Peptide banden (Trojer et al., 2007).

A



B

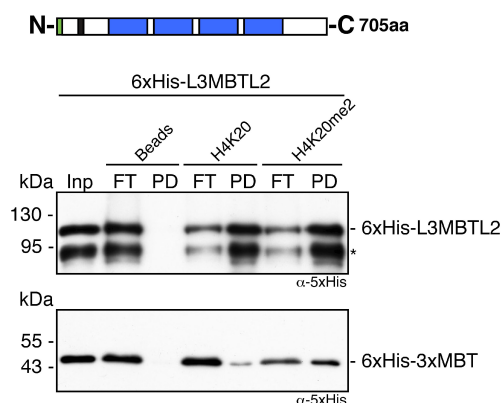


Abbildung 4.11: 6xHis-L3MBTL2 bindet an den N-Terminus von Histon H4

A) 6xHis-4xMBT bindet spezifisch an H4K20me2 Für den Peptid-Pulldown wurden 5 µg der H4K20- bzw. H4K20me2-Peptide an je 20 µl SulfoLink Coupling Agarose gebunden. Nach dem Absättigen freier Peptidbindungsstellen mit 50 mM L-Cystein und dem Blocken mit 1 mg/ml BSA erfolgte die Inkubation mit je 30 µg aufgereinigtem rekombinantem 6xHis-4xMBT bzw. 1 µg 6xHis-3xMBT für eine Stunde auf einem Drehrad bei 4 °C. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer abgelöst, denaturiert und nach Auftrennung in einem 10%-igen SDS-PAA-Gel und Western Blotting mittels eines α-5xHis Antikörper analysiert. Nach der Bindung wurden 10% des Überstands (FT) mithilfe von StrataClean Beads konzentriert. Input: 10% **B) 6xHis-L3MBTL2 bindet an den N-Terminus von Histon H4** Für die Analyse der Bindung von volle Länge L3MBTL2 wurde wie in A vorgegangen, wobei 10 µg der Peptide gekoppelt wurden. Die eingesetzten Proteinmengen von 6xHis-L3MBTL2 wurden anhand eines Coomassie Gels im Vergleich zum vorherigen Experiment abgeschätzt. Gebundene Proteine wurden in einem 6%-igen (6xHis-L3MBTL2) bzw. 10%-igen (6xHis-3xMBT) SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mit einem α-5xHis Antikörper analysiert. Nach der Bindung wurden 20% des Überstands (FT) mittels TCA-Fällung konzentriert. Input: 10%; *: Abbauprodukt

Proteinschemata MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), 6xHis-Tag (grün)

Wie in Abbildung 4.11 A dargestellt, wiesen die isolierten MBT-Domänen von L3MBTL2 wie auch die Positivkontrolle eine deutliche Präferenz für die Bindung des H4K20me2-Peptids auf. Die Bindungsaffinität von 6xHis-4xMBT war dabei verglichen mit der von 6xHis-3xMBT etwas geringer. Im Gegensatz zu den isolierten MBT-Domänen zeigte volle Länge L3MBTL2 eine selektive Bindung an beide Peptide. Die Bindung selbst erfolgte jedoch unabhängig von der Methylierung des Lysinrests 20.

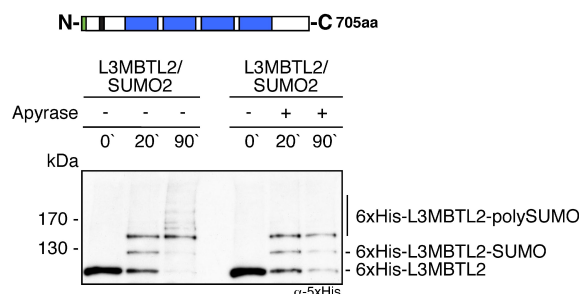
4.2.1.2 Die SUMOylierung von L3MBTL2 hat keinen Einfluss auf die Bindung an N-terminale Histonenden

Um den Einfluss der SUMOylierung von L3MBTL2 auf dessen Bindung an methylierte Histonenden zu untersuchen, wurden Peptid-Bindungsstudien mit *in vitro* SUMOyliertem rekombinantem L3MBTL2 durchgeführt. Aufgrund der für unmodifiziertes 6xHis-L3MBTL2 bereits vorliegenden Ergebnisse (Abbildung 4.11 B) sollte das Protein zu gleichen Teilen in den beiden SUMOylierten und der nicht modifizierten Form vorliegen. Da die *in vitro* SUMOylierung von L3MBTL2 mit SUMO2 jedoch zu einer PolySUMOylierung führt (Abbildung 4.9 A), wurde die Reaktion durch Zugabe der Phosphatase Apyrase abgestoppt. Das Enzym Apyrase katalysiert die Hydrolyse von ATP zu AMP und anorganischem Phosphat (Kettlun et al., 1982). Dadurch wurde die ATP-abhängige Aktivierung von SUMO innerhalb weniger Minuten unterbunden. Zur gezielten SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 erfolgte die bereits in Abschnitt 4.1.5 beschriebene *in vitro* SUMOylierung mit SUMO2, wobei einem von zwei identischen Reaktionsansätzen nach 20 Minuten Apyrase zugesetzt wurde. Um die Reaktion zu verfolgen, wurden aus beiden Ansätzen zum Zeitpunkt der ATP-Zugabe sowie nach 20 bzw. 90 Minuten Proben zur Analyse im Western Blot entnommen. Abbildung 4.12 A zeigt, dass nach 20 Minuten in beiden Ansätzen gleiche Mengen der beiden SUMOylierten und der nicht modifizierten Form von 6xHis-L3MBTL2 vorlagen. Die Verlängerung der Reaktionszeit führte im Kontrollansatz zur PolySUMOylierung des Proteins. Durch Zugabe von Apyrase lag hingegen auch nach 90 Minuten jede der drei Formen von L3MBTL2 weiterhin zu gleichen Anteilen vor.

Zur Analyse des Effekts der SUMOylierung auf die Bindung von L3MBTL2 an methylierte Histonenden erfolgte zunächst die gezielte Modifikation von rekombinantem 6xHis-L3MBTL2 mit SUMO2. Als Kontrolle verblieb ein Ansatz ohne ATP. Beide Reaktionsansätze wurden für Bindungsstudien mit H4K20- und H3K9-Peptiden verschiedener Methylierungsgrade eingesetzt (Abbildung 4.12 B). Als Positivkontrolle dienten erneut die rekombinanten MBT-Domänen von L3MBTL1. Die Analyse der Bindung von 6xHis-L3MBTL2 an den N-Terminus von Histon H4 zeigte, dass weder unmodifiziertes 6xHis-L3MBTL2 noch eine der beiden SUMOylierten Formen spezifisch an eines der vier Peptide band (Abbildung 4.12 B

links). Dementgegen wies die Positivkontrolle eine spezifische Bindung der mono- und dimethylierten H4K20-Peptide auf (Abbildung 4.12 B links unten).

A



B

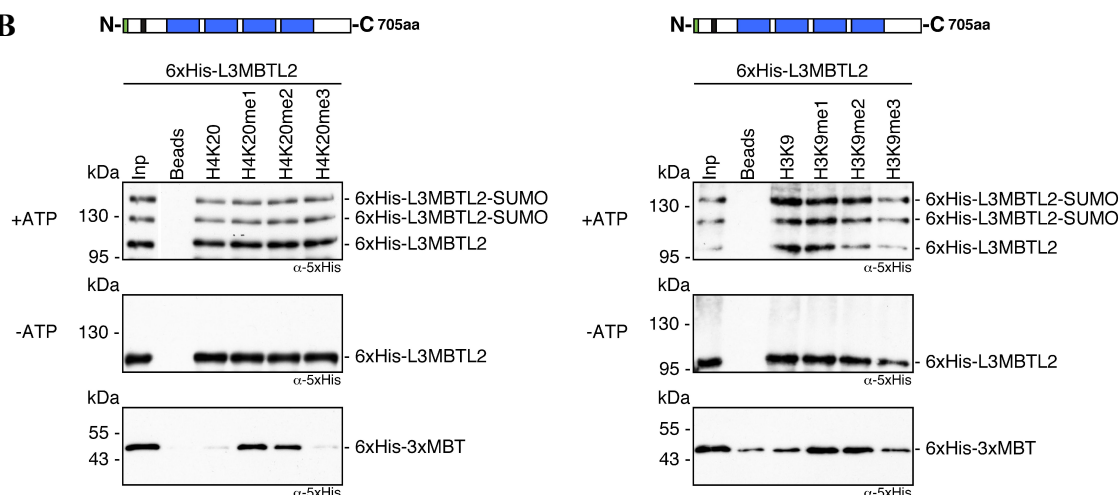


Abbildung 4.12: Die SUMOylierung von L3MBTL2 hat keinen Einfluss auf die Bindung an N-terminale Histonenden

A) Partielle SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 Zur gezielten *in vitro* SUMOylierung von L3MBTL2 wurden ca. 4 µg rekombinantes aufgereinigtes 6xHis-L3MBTL2 zusammen mit je 1,5 ng/µl 6xHis-AOS1/UBA2, 2,5 ng/µl UBC9 und 5 ng/µl SUMO2 in einem Gesamtvolumen von 40 µl bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet. Nach 20 min erfolgte die Zugabe von 0,05 U Apyrase (1 U/µmol ATP). Ein Reaktionsansatz verblieb als Kontrolle ohne Apyrase. Zur Verfolgung der Reaktionskinetik wurden aus beiden Ansätzen zum Zeitpunkt der ATP-Zugabe sowie 20 min und 90 min nach Zugabe von ATP 10 µl entnommen, mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und die SUMOylierung von L3MBTL2 nach Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel im Western Blot mithilfe eines α-5xHis Antikörpers analysiert. **B) Die SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 wirkt sich nicht auf die Bindung an N-terminale Histonenden aus** Für den Peptid-Pulldown wurden 10 µg der Peptide H4K20, H4K20me1, H4K20me2, H4K20me3 bzw. H3K9, H3K9me1, H3K9me2 oder H3K9me3 an je 20 µl SulfoLink Coupling Agarose gebunden. Gleichzeitig

erfolgte die in A) beschriebene *in vitro* SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 in einem Gesamtvolumen von 730 µl, wobei eine Kontrolle ohne ATP verblieb. Nach dem Absättigen freier Peptidbindungsstellen mit 50 mM L-Cystein und dem Blocken der Beads mit 1 mg/ml BSA erfolgte die Inkubation der immobilisierten Peptide mit dem *in vitro* SUMOylierten 6xHis-L3MBTL2 (+/-ATP) bzw. mit 6xHis-3xMBT für eine Stunde auf einem Drehrad bei 4 °C. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer denaturiert und nach Auftrennung in einem 6%-igen (6xHis-L3MBTL2) bzw. 10%-igen (6xHis-3xMBT) SDS-PAA-Gel im Western Blot durch einen α-5xHis Antikörper analysiert. Input:10%

Proteinschemata MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), 6xHis-Tag (grün)

Ein etwas anderes Ergebnis zeigte sich für die Bindung von 6xHis-L3MBTL2 an den N-Terminus von Histon H3. Auch in diesem Fall wurden keine Unterschiede in der Affinität der Peptidbindung zwischen unmodifiziertem L3MBTL2 und dessen SUMOylierten Formen festgestellt. Jedoch wiesen alle drei Formen von L3MBTL2 eine bevorzugte Bindung an den unmethylierten N-Terminus von Histon H3 auf, die infolge der Mono-, Di- und Trimethylierung von Lysin 9 graduell abnahm (Abbildung 4.12 B rechts). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls für unmodifiziertes 6xHis-L3MBTL2 aus dem Kontrollansatz der *in vitro* SUMOylierung (Abbildung 4.12 B rechts Mitte). Die Positivkontrolle wies neben einer schwachen unspezifischen Bindung an die Beads eine klare Präferenz für die Bindung der mono- und dimethylierten H3K9-Peptide auf (Abbildung 4.12 rechts unten).

Um auch die Kinetik der L3MBTL2 Bindung an H4K20- und H4K20me2-Peptide zu untersuchen, wurden die Peptide für verschiedene Zeiträume mit *in vitro* SUMOyliertem 6xHis-L3MBTL2 inkubiert. Wie aus Abbildung 4.13 hervorgeht, nahm die Bindung von unmodifiziertem und SUMOyliertem 6xHis-L3MBTL2 an beide Peptide mit der Zeit zu. Die Affinität wie auch die Spezifität der Peptidbindung wies jedoch zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen unmodifiziertem und SUMOyliertem 6xHis-L3MBTL2 auf.

Zusammenfassend wurde im Rahmen der hier durchgeführten Peptid-Bindungsstudien kein Effekt der L3MBTL2 SUMOylierung auf die Bindung von L3MBTL2 an N-terminale Histonenden festgestellt.

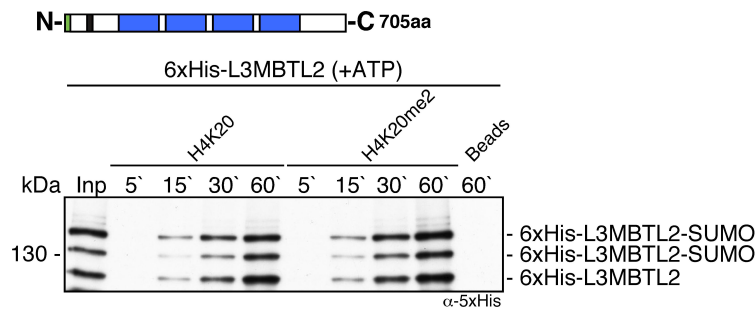


Abbildung 4.13: Die Kinetik der Bindung an N-terminale Histonenden wird nicht durch die SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 beeinflusst

Die *in vitro* SUMOylierung von 6xHis-L3MBTL2 erfolgte wie in Abbildung 4.12 A in einem Gesamtvolumen von 1000 μ l. Der Peptid-Pulldown wurde wie in Abbildung 4.11 A beschrieben durchgeführt, wobei je Ansatz 10 μ g des Peptids gekoppelt wurden. Die Inkubation erfolgte in unabhängigen Ansätzen für 5, 15, 30 bzw. 60 min auf einem Drehrad bei 4 °C. Die Beads wurden mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und die Bindung nach Auftrennung der Proteine in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel durch Western Blotting mithilfe eines α -5xHis Antikörpers analysiert. Input: 10%

Proteinschemata MBT-Domänen (hellblau), Zinkfinger (schwarz), 6xHis-Tag (grün)

4.2.2 Etablierung von Säugerzelllinien zur stabilen Expression von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2

Um die Bedeutung der SUMOylierung für die Funktion von L3MBTL2 *in vivo* zu analysieren, wurden Säugerzelllinien generiert, die wildtypisches bzw. SUMOylierungs-defizientes 3xFLAG-L3MBTL2 konstitutiv exprimieren. Dafür wurden HEK-Zellen mit linearisierten Expressionskonstrukten für 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R transfiziert und auf eine stabile Integration hin selektioniert. Nach dem Vereinzeln positiver Zellen wurde für 23 wildtypische bzw. 28 SUMOylierungs-defiziente Einzelklone die Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 mittels Western Blotting kontrolliert. Die Analyse der in Abbildung 4.14 exemplarisch dargestellten Klone zeigte in allen Fällen eine Bande auf der für volle Länge L3MBTL2 erwarteten Höhe. Für die Klone 8 und 12 waren darüber hinaus beide SUMOylierten Formen von wildtypischem 3xFLAG-L3MBTL2 detektierbar. Ein Vergleich der Signale von 3xFLAG-L3MBTL2 mit denen des endogenen Proteins in der mock Kontrolle zeigte eine deutliche Überexpression der 3xFLAG-Fusionsproteine. Für weiterführende Experimente wurden die Zelllinien HEK-3xFLAG-L3MBTL2 Klon 8 und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 1 ausgewählt (Abbildung 4.14 A). Im Zuge fortlaufend durchgeführter

Expressionskontrollen stellte sich jedoch heraus, dass die Expression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R in Klon 1 mit zunehmender Passagenzahl abnahm und das Gen schließlich fast vollständig abgeschaltet wurde (Abbildung 4.14 B). Aus diesem Grund diente der die SUMOylierungs-defiziente Mutante von 3xFLAG-L3MBTL2 exprimierende Klon 21 in späteren Experimenten als Ausgangszelllinie.

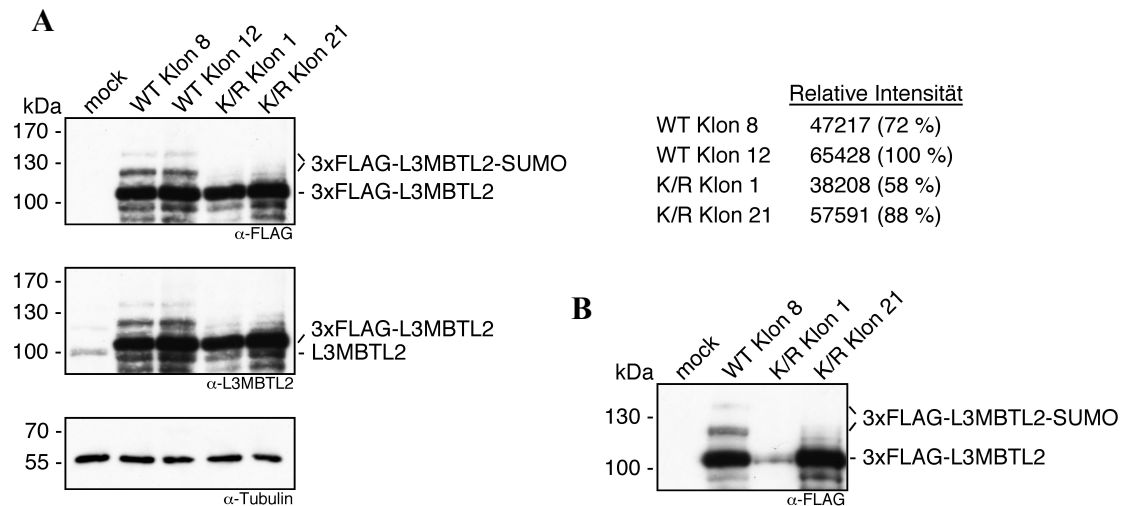


Abbildung 4.14: Etablierung stabiler Zelllinien zur Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R

A) Nachweis und Quantitierung der Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 in ausgewählten Zellklonen 10 µg von SDS-Gesamtzellextrakten aus HEK-Zellen, sowie aus Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 bzw. Klon 12 und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 1 bzw. Klon 21 wurden in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und die Expression nach Western Blotting mit α-FLAG und α-L3MBTL2 Antikörpern analysiert. Zur Quantitierung mithilfe des LICOR Odyssey wurden je 20 µg der Gesamtzellextrakte in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mittels eines α-FLAG und α-mouse IRDye 800 CW Antikörpers detektiert. Die Tabelle zeigt die relative Intensität der Signale. Die Absolutwerte der Fluoreszenzen wurden auf die für Tubulin erhaltenen Signale normalisiert. In den wildtypischen Klonen wurden die Absolutwerte der unmodifizierten Form und die der SUMOylierten Formen zuvor addiert. In Klammern angegeben ist das Verhältnis der relativen Intensitäten in Prozent im Vergleich zum wildtypischen Klon 12. **B) Die Expression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R in Klon 1 wird mit steigender Passagenzahl abgeschaltet** Zur Kontrolle der Expression nach mehrfachem Passagieren wurden 32 µg von SDS-Gesamtzellextrakten aus HEK-Zellen, sowie aus Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 1 bzw. Klon 21 in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Western Blotting mit einem α-FLAG Antikörper analysiert.

WT : HEK-Zellen mit stabiler Expression von wildtypischem 3xFLAG-L3MBTL2,

K/R: HEK-Zellen mit stabiler Expression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R.

4.2.3 Identifizierung der genomweiten Bindungsstellen von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 in Säugerzellen

Um den Einfluss der SUMOylierung von L3MBTL2 auf dessen Rekrutierung an Chromatin zu untersuchen, wurden die genomweiten Bindungsstellen von endogenem L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R in HEK-Zellen mittels ChIP-Sequenzierung (ChIP-Seq) ermittelt. Dazu wurde Chromatin aus untransfizierten bzw. stabil mit 3xFLAG-L3MBTL2 oder 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R transfizierten HEK-Zellen isoliert und für Immunpräzipitationen (IPs) mit einem α -L3MBTL2 bzw. α -FLAG Antikörper eingesetzt (durchgeführt in Kollaboration mit Dr. Bastian Stielow). Als Negativkontrolle diente zum einen eine α -FLAG IP mit Chromatin aus HEK-Zellen. Zum anderen erfolgte ein ChIP-Experiment mit Chromatin der Zelllinie HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt unter Verwendung eines unspezifischen Kaninchen IgGs. Zur Identifizierung der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 wurde die präzipitierte DNA in Kollaboration mit Maren Scharfe und Michael Jarek (Helmholtz Zentrum Braunschweig) amplifiziert und mithilfe des Illumina Genome Analyzers Iix sequenziert. Die bioinformatische Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte durch Florian Finkernagel am IMT Marburg. Die Tabelle 4.1 zeigt eine Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der ChIP-Seq-Ergebnisse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Sequenzierungen nach Chromatin-Immunpräzipitation in HEK-Zellen sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21.

Zelllinie	HEK293	HEK293- 3xFLAG-WT	HEK293- 3xFLAG-K/R	HEK293	HEK293- 3xFLAG-WT
Antikörper	α -L3MBTL2	α -FLAG	α -FLAG	α -FLAG	IgG
Gesamtreadzahl ($\times 10^6$)	38,2	43,8	40,5	52,7	43,4
Peaks (FDR <0,001)	8009	14986	9664	-	-
Peaks +/-1250 bp zum TSS	6396	11374	7550	-	-
Gene mit Peak +/-1250 bp zum TSS	7764	12873	8982	-	-
Durchschnittliche Reads/Peak	23,86	21,36	19,64	-	-

Alle fünf Sequenzierungen lieferten ähnliche Gesamtreadzahlen (siehe Tabelle 4.1). Die Zahl der Reads von endogenem L3MBTL2 und die der IgG Kontrolle beruhen dabei auf je zwei fusionierten ChIP-Seq Experimenten. Mithilfe des MACS Algorithmus (Zhang et al., 2008b) wurden die jeweiligen Reads 8009 endogenen L3MBTL2 Peaks (siehe Tabelle A1), 14986 Peaks für 3xFLAG-L3MBTL2 und 9664 Peaks für 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R zugeordnet (siehe Tabelle 4.1). Die maximale False Discovery Rate (FDR) aller Peaks war $<0,001$. Die Kontrollsequenzierungen wiesen unter diesen Bedingungen keine Peaks auf. Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch Ausschnitte des Genome Browsers für einen stark (*PHF20* Promotor) sowie einen schwach (*LOX* Promotor) durch L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gebundenen Promotor.

Die Fusion aller Peaks von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R ergab 16569 unabhängige (unique) Peaks einer FDR $<0,001$ (siehe Tabelle A2), die in mindestens einer der drei Sequenzierungen auftraten (Abbildung 4.16 A). Fanden sich dabei in einer Sequenzierung zwei nahe benachbarte, jedoch getrennte Peaks, die in einer anderen Sequenzierung in einem Peak zusammengefasst wurden, wurde in beiden Sequenzierungen nur ein Peak gezählt. Aus diesem Grund entspricht die Gesamtzahl der Peaks jeder einzelnen Sequenzierung in Abbildung 4.16 A nicht der in Tabelle 4.1. Infolge der Überlappung von Peaks ergaben sich somit 7826 anstelle von 8009 Peaks für endogenes L3MBTL2, 14744 anstelle von 14986 Peaks für 3xFLAG-L3MBTL2 und 9383 anstelle von 9664 Peaks für 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R.

5294 (75%) der insgesamt 16569 unabhängigen Peaks wurden in allen drei Sequenzierungen nachgewiesen. 1620 der 16569 Peaks wiesen neben endogenem L3MBTL2 eine spezifische Rekrutierung von 3xFLAG-L3MBTL2 auf. 111 der 16569 Peaks zeigten ein spezifisches Signal für 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R (Abbildung 4.16 A). Die auf einer FDR $<0,001$ basierte Analyse der ChIP-Sequenzierungen implizierte daher, dass 1620 Bindungsstellen nach Überexpression von L3MBTL2 eine spezifische Rekrutierung von 3xFLAG-L3MBTL2 aufweisen, 111 Bindungsstellen dagegen spezifisch durch die SUMOylierungs-defiziente Mutante von L3MBTL2 gebunden werden.

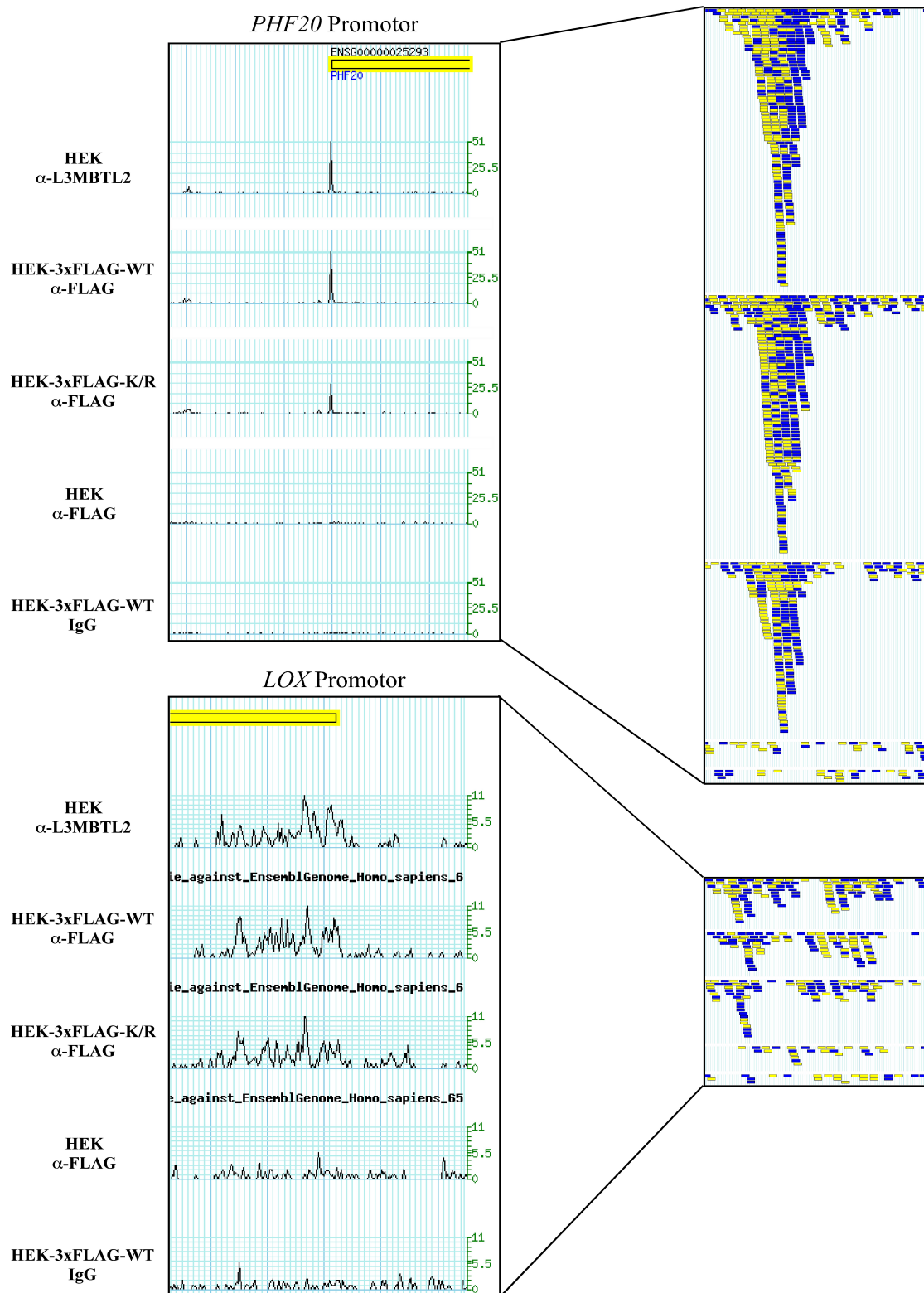


Abbildung 4.15: Ausgewählte Peaks der ChIP-Seq von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R

Dargestellt sind Ausschnitte des Genome Browsers eines sehr starken (*PHF20* Promotor) sowie eines schwachen (*LOX* Promotor) Peaks von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R. Die Vergrößerung der Peaks (rechts) zeigt die einzelnen Reads jedes Peaks.

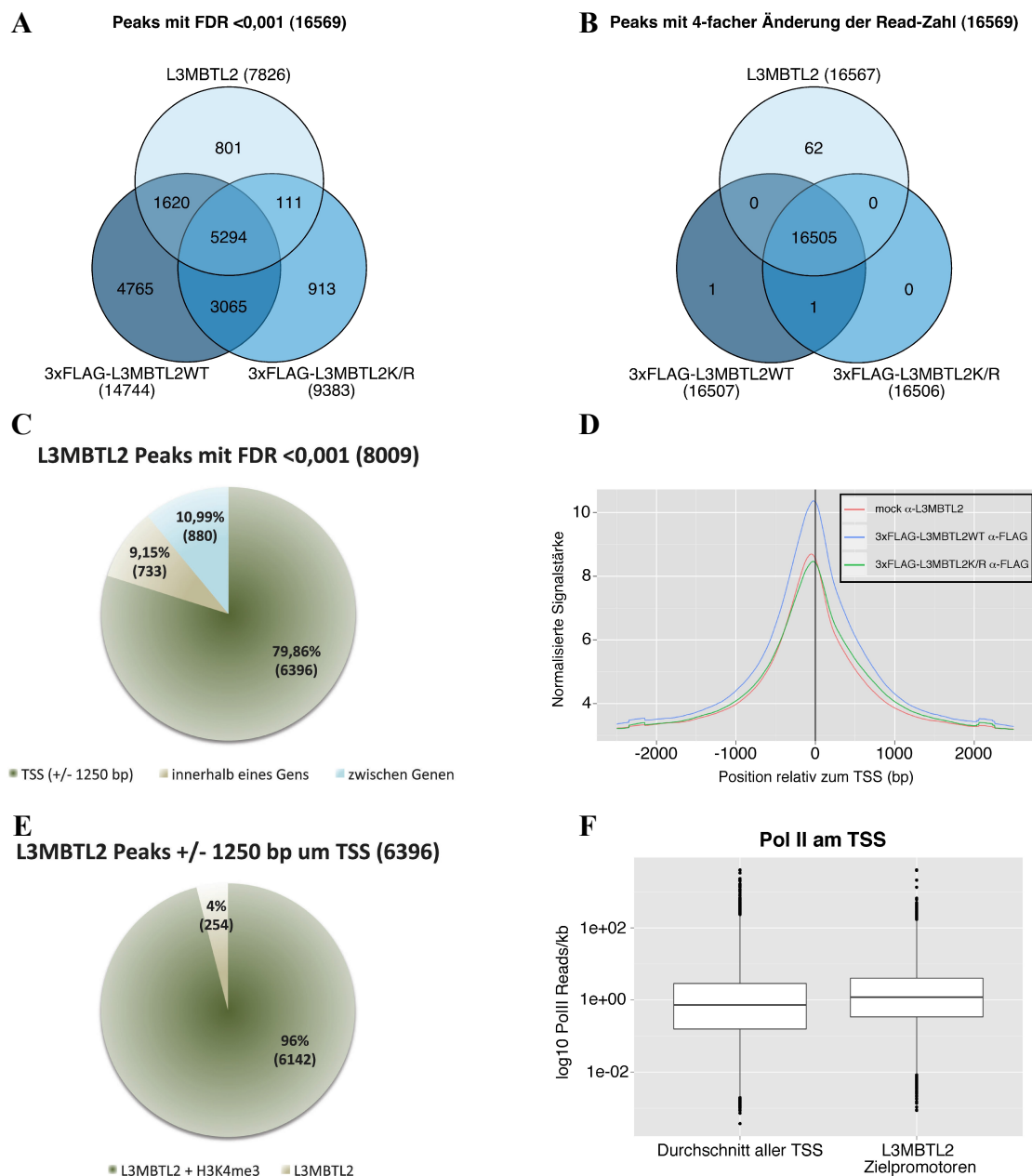


Abbildung 4.16: Analyse der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2

A) Fusion aller für L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R mithilfe von MACS identifizierten Peaks einer FDR <0,001. **B)** Fusion aller für L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R mithilfe von MACS identifizierten Peaks anhand der vierfachen Änderung der Read-Zahl jedes Peaks gegenüber den beiden anderen Sequenzierungen. **C)** Genomische Verteilung der Peaks von L3MBTL2 einer FDR <0,001 relativ zu annotierten Genen. **D)** Position der Reads von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R relativ zu Transkriptionsstartpunkten. **E)** Überlappung der 6396 L3MBTL2 Peaks +/- 1250 Bp relativ zu Transkriptionsstartpunkten mit H3K4me3. **F)** Präsenz der RNA Polymerase II auf von endogenem L3MBTL2 gebundenen Promotoren im Vergleich zum Durchschnitt aller Transkriptionsstartpunkte.

Die stichprobenartig durchgeführte visuelle Inspektion der insgesamt 8743 α -FLAG spezifischen Peaks ergab jedoch, dass an jeder der untersuchten Positionen Peaks in allen drei Sequenzierungen auftraten. Allerdings erreichten nicht alle Peaks den angelegten Schwellenwert einer FDR $<0,001$ und wurden daher nicht als Peak gewertet. Aufgrund der Diskrepanz zwischen FDR-basierter Analyse und visueller Inspektion wurden die insgesamt 16569 Peaks unter weniger stringenten Bedingungen erneut auf spezifische Peaks für L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 oder 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R hin untersucht (Abbildung 4.16 B). Die auf einer vierfachen Änderung der Readzahl jedes Peaks gegenüber den beiden anderen Sequenzierungen basierende Analyse zeigte, dass 99,6% der 16569 Peaks in allen drei Sequenzierungen auftraten. Dabei wurde weder für 3xFLAG-L3MBTL2 noch für 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R eine spezifische Bindungsstelle identifiziert, die auch durch endogenes L3MBTL2 gebunden wurde. Zusammenfassend ergaben die ChIP-Seq Analysen daher keinen Hinweis darauf, dass die SUMOylierung von L3MBTL2 dessen Rekrutierung an endogene Bindungsstellen beeinflusst.


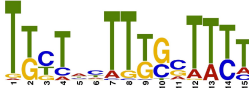
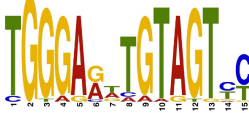
Nach der Identifizierung der 8009 genomweiten Bindungsstellen von endogenem L3MBTL2 (siehe Tabelle A1) wurde deren Position relativ zu Transkriptionsstartpunkten (TSSs) sowie Bereichen innerhalb und außerhalb von Genen analysiert (Abbildung 4.16 C). Die Untersuchung der genomischen Verteilung ergab, dass sich 79,86% (6396) der L3MBTL2 Peaks im Bereich von ± 1250 Bp relativ zu Transkriptionsstartpunkten befinden. Ein Vergleich aller Reads der Sequenzierung von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R mit annotierten Genen identifizierte zudem die Peakzentren für alle drei Proteine unmittelbar oberhalb von Transkriptionsstartpunkten (Abbildung 4.16 D). Wie in Tabelle 4.1 dargestellt, wurden die 6396 ± 1250 Bp relativ zu Transkriptionsstartpunkten gelegenen Peaks 7764 Genen zugeordnet (siehe Tabelle A3), von denen 6399 annotiert waren. Die Abweichung zwischen den 6396 L3MBTL2 Peaks und den 7764 zugeordneten Genen ist dabei auf die Überlappung einzelner Peaks mit Promotoren verschiedener, nahe benachbarter Gene zurückzuführen.

Aufgrund der präferentiellen Bindung von L3MBTL2 an Promotoren wurde untersucht, ob es sich bei den Zielgenen von L3MBTL2 um aktive oder inaktive Gene handelt. Als Referenz diente die Histonmodifikation H3K4me3, welche aktive Gene kennzeichnet. Ein Vergleich der 6396 ± 1250 Bp relativ zu

Transkriptionsstartpunkten gelegenen L3MBTL2 Peaks mit denen von H3K4me3 (GSM945288) ergab, dass 96% (6142) der Peaks mit H3K4me3 überlappten. Folglich handelt es sich bei den durch L3MBTL2 gebundenen Genen sehr wahrscheinlich nicht um inaktive Gene (Abbildung 4.16 E). Neben der starken Korrelation zwischen L3MBTL2 Peaks und H3K4me3 zeigte ein Vergleich der 8009 endogenen L3MBTL2 Peaks mit publizierten Bindungsdaten der promotor-assoziierten RNA Polymerase II (GSM935534) eine erhöhte Präsenz der Polymerase (Abbildung 4.16 F). Zusammenfassend ergab die Analyse der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 somit, dass L3MBTL2 vor allem an Promotoren aktiver Gene rekrutiert wird.

Zur Identifizierung von Bindungsmotiven innerhalb der Bindungssequenzen von L3MBTL2 wurden die zentralen 100 Bp von 600 zufällig ausgewählten Peaks mithilfe des MEME-ChIP Algorithmus (Machanic and Bailey, 2011) analysiert. Abbildung 4.17 A zeigt die drei häufigsten Motive. Ein Vergleich dieser Motive mit Bindungssequenzen bekannter Transkriptionsfaktoren mittels TOMTOM (Gupta et al., 2007) identifizierte das Motiv CACGTG als klassische E-Box, die unter anderem als Bindungsstelle der Transkriptionsfaktoren MYC, ARNT und USF1 fungiert. Die beiden mit geringerer Häufigkeit und Signifikanz aufgetretenen Bindungsmotive wurden den Transkriptionsfaktoren HMGA1 und ZNF143 zugeordnet (Abbildung 4.17 A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der MEME-ChIP Analyse ergab die Analyse der zentralen 300 Basenpaare aller L3MBTL2 Peaks einer FDR <0,001 mithilfe des Centrimo Programms (Bailey and Machanic, 2012) ebenfalls die E-Box als das Motiv größter Signifikanz (Abbildung 4.17 B). Das Bindungsmotiv von E2F Transkriptionsfaktoren wurde trotz der Assoziation von L3MBTL2 und E2F6 (Ogawa et al., 2002; Trojer et al., 2011; Gao et al., 2012) durch keine der beiden Analysen innerhalb der Bindungssequenzen von L3MBTL2 identifiziert.

Um Hinweise auf die biologischen und molekularen Funktionen von L3MBTL2 Zielgenen zu erhalten, wurden funktionale Analysen unter Verwendung der MsigDB (Subramanian et al., 2005), DAVID (Huang et al., 2009) und der Pathway interaction database (Schaefer et al., 2009) durchgeführt (siehe Tabelle A4). Da die Zahl der untersuchten Zielgene mit 6399 annotierten Genen sehr groß war, ergab die Analyse erwartungsgemäß ein sehr breites Spektrum biologischer und molekularer Funktionen. Abbildung 4.17 C zeigt eine Auswahl funktionaler Gruppen mit einem signifikant erhöhten Anteil durch L3MBTL2 gebundener Gene.

Motiv	Häufigkeit	E-Wert	Transkriptionsfaktor
	41/600	2,2E-004	MYC, ARNT, USF1
	34/600	4,2E-008	HMGA1
	26/600	1,1E-039	ZNF143

Biologische Prozesse und molekulare Funktionen	Benjaminwerte
GO_BP: Nukleosid-, Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus	7,43E-67
GO_BP: Genexpression	1,19E-45
GO_BP: RNA Biosynthese	2,67E-34
GO_BP: Zellzyklus	2,16E-27
GO_BP: DNA-Reparatur	1,60E-15
GO_BP: Mitotischer Zellzyklus	6,89E-15
GO_BP: Antwort auf Stimulus für DNA-Schäden	2,47E-14
GO_MF: Bindung an Nukleinsäuren	5,87E-51
GO_MF: Transkriptionsregulation	2,81E-22
GO_MF: Ubiquitin-Proteinligaseaktivität	2,21E-05

zugeordnet. Das Bindungsmotiv der E2F Transkriptionsfaktoren wurde nicht nachgewiesen. C) **Funktionale Analyse der Zielgene von endogenem L3MBTL2** Dargestellt sind zehn exemplarisch ausgewählte funktionale Gruppen mit den entsprechenden Benjaminiwerten nach Analyse der Zielgene von endogenem L3MBTL2 (FDR <0,001) mithilfe der MsigDB, DAVID und der Pathway interaction database.

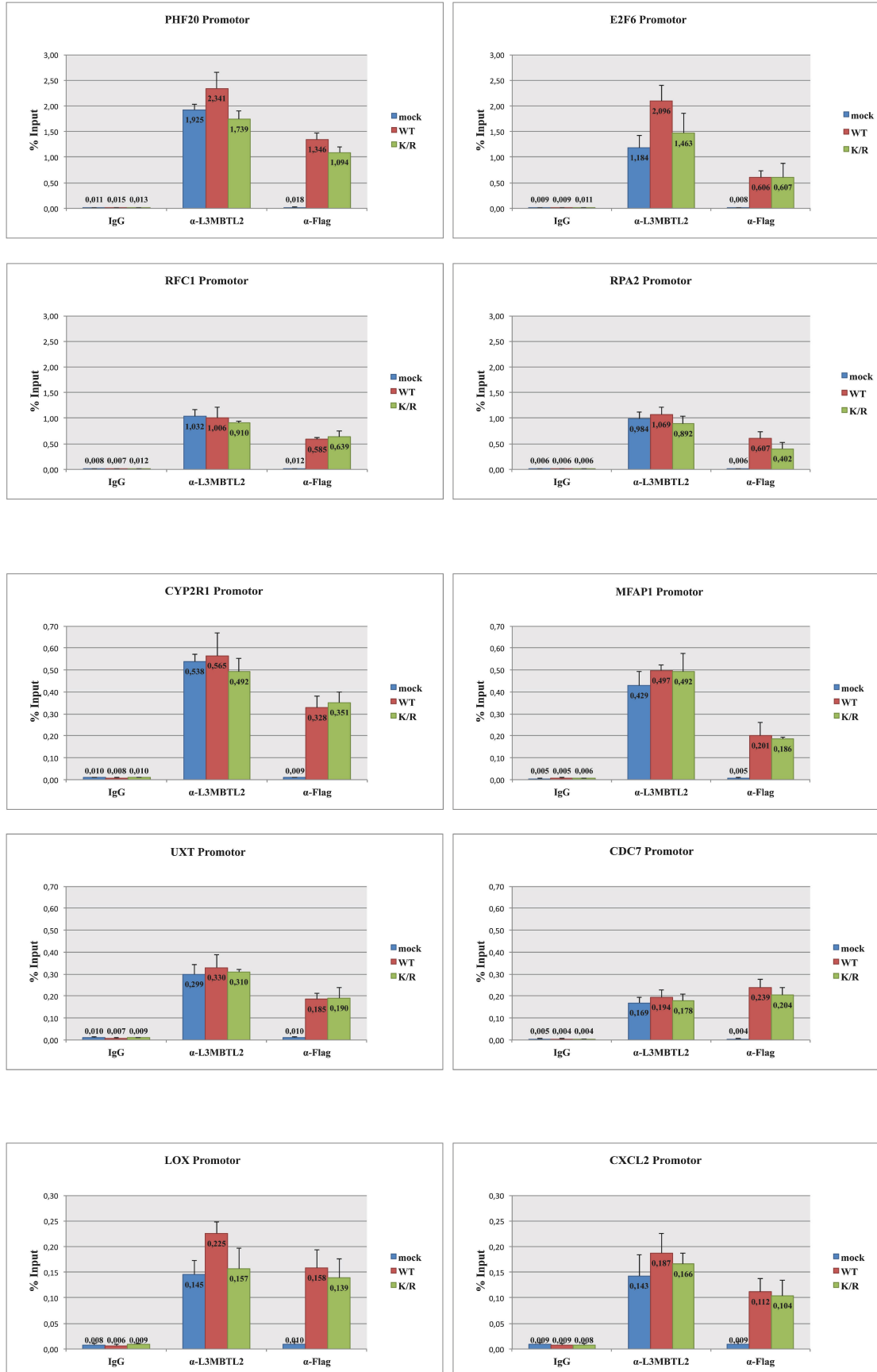
Die größte Signifikanz im Bereich biologischer Prozesse zeigte die Gruppe des Nukleosid-, Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus, im Bereich der molekularen Funktionen die „Bindung an Nukleinsäuren“. Ebenfalls überrepräsentiert waren Prozesse wie „RNA Biosynthese“, „Zellzyklus“ und „DNA-Reparatur“ sowie die molekularen Funktionen „Transkriptionsregulation“ und „Ubiquitin-Proteinligase-aktivität“.

4.2.3.1 Validierung der mittels ChIP-Seq identifizierten Bindungsstellen von L3MBTL2

Um die Aussagekraft der ChIP-Seq Daten zu untermauern, wurden Validierungsexperimente in Form von ChIP-qPCR Analysen von Dr. Bastian Stielow durchgeführt. Diese wurden zur Vervollständigung der ChIP-Seq Ergebnisse in diese Arbeit mit aufgenommen. Als Grundlage der Untersuchungen diente Chromatin aus untransfizierten sowie 3xFLAG-L3MBTL2 oder 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R stabil exprimierenden HEK-Zellen. Die Auswahl der analysierten Promotoren basierte auf der visuellen Untersuchung der für L3MBTL2 identifizierten Peaks einer FDR <0,001. Dabei wurden starke Peaks mit einer großen Readzahl von schwachen Peaks mit einer geringeren Readzahl unterschieden. Als Negativkontrolle diente ein Bereich von 2000 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts von *CDC7*.

Die qPCR-Analysen der ChIPs von L3MBTL2 bestätigten die Rekrutierung von endogenem L3MBTL2 an alle der in Abbildung 4.18 dargestellten Promotoren (mock α -L3MBTL2). Aufgrund deutlicher Unterschiede in der Stärke der Rekrutierung wurden sehr stark durch L3MBTL2 gebundene (*PHF20*, *E2F6*, *RFC1*, *RPA2*), stark gebundene (*CYP2R1*, *MFAP1*, *UXT*, *CDC7*) und schwach gebundene (*LOX*, *CXCL2*, *ESRP2*, *JAM2*) Promotoren voneinander unterschieden. Auch nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 (WT α -L3MBTL2) bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R (K/R α -L3MBTL2) wurden vergleichbare Mengen von L3MBTL2 nachgewiesen.

Ergebnisse



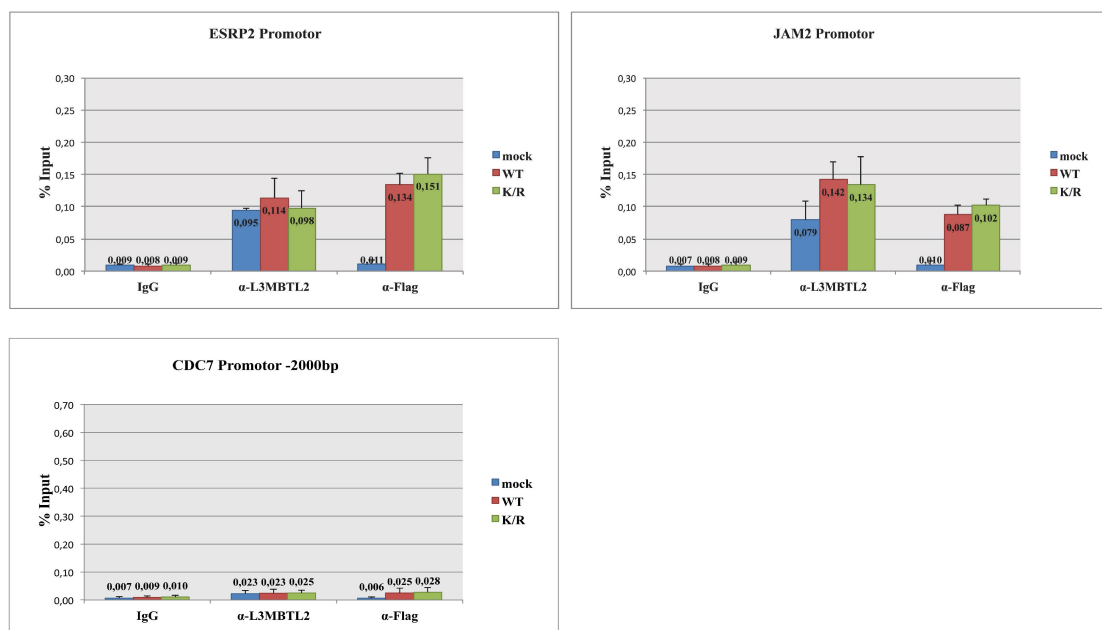


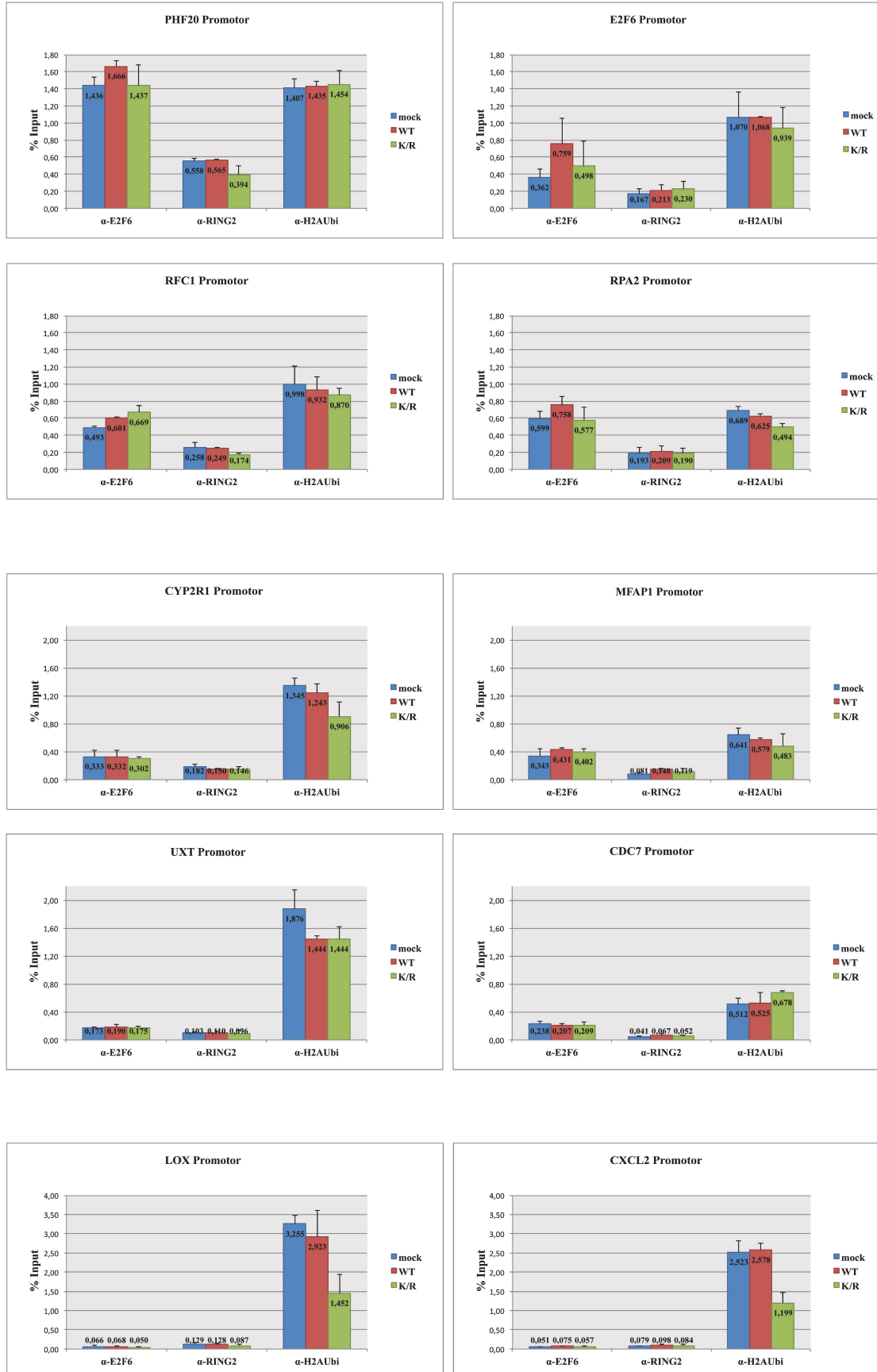
Abbildung 4.18: Validierung mittels ChIP-Seq identifizierter Zielgene von L3MBTL2

Zur Validierung der Bindung von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wurden ChIP-qPCR-Experimente mit Chromatin aus HEK-Zellen (mock) sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 (WT) und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 (K/R) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Bereich -2000 Bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt von *CDC7*.

Daher kann vermutet werden, dass endogenes L3MBTL2 an Zielpromotoren gegen 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R ausgetauscht wird. Eine α-FLAG IP zeigte zudem die gegenüber endogenem L3MBTL2 spezifische Rekrutierung von wildtypischem bzw. SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 an alle analysierten Promotoren (Abbildung 4.18).

L3MBTL2 wurde gemeinsam mit E2F6 und RING2 als Teil des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002) und PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) Komplexes identifiziert. Um die Rekrutierung von E2F6 und RING2 sowie die von RING2 katalysierte Monoubiquitinierung von H2AK119 an L3MBTL2 Zielpromotoren zu untersuchen, wurden ChIP-qPCR Analysen der bereits in Abbildung 4.18 analysierten Promotoren durchgeführt (Abbildung 4.19). E2F6, RING2 und monoubiquitiniertes H2A wurden an allen L3MBTL2 Zielpromotoren nachgewiesen. Dabei wurde an keinem Promotor ein signifikanter Unterschied in der Rekrutierung von E2F6 und RING2 bzw. der Ubiquitinierung von H2A zwischen untransfizierten und 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R stabil exprimierenden HEK-Zellen festgestellt.

Ergebnisse



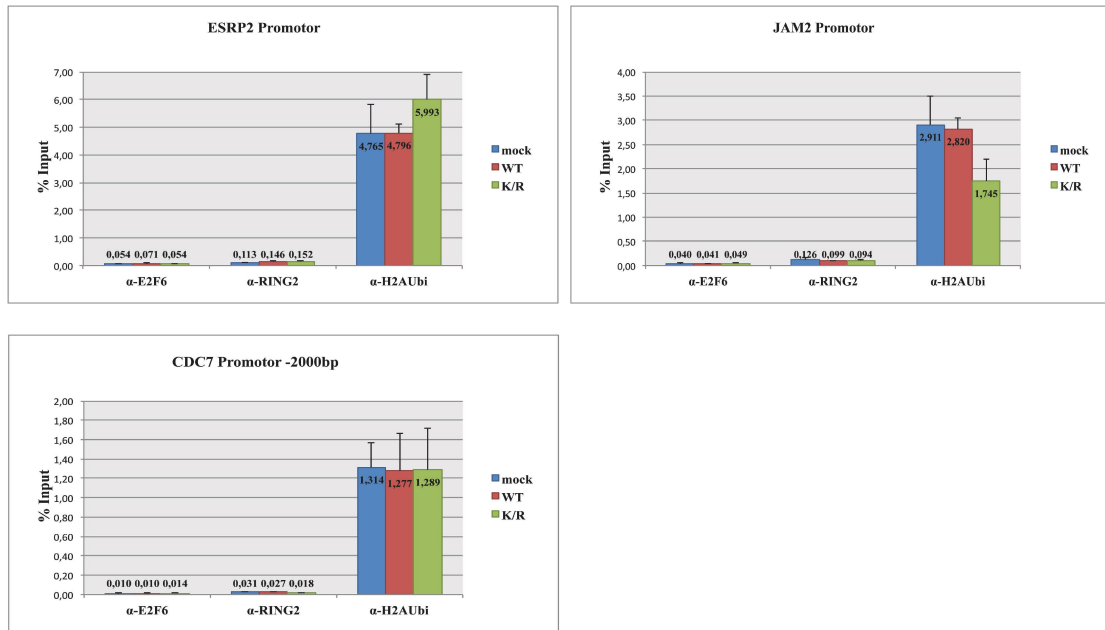


Abbildung 4.19: Nachweis von E2F6, RING2 und monoubiquitiniertem H2AK119 an Zielpromotoren von L3MBTL2

Zur Untersuchung der Rekrutierung von E2F6 und RING2 bzw. der Monoubiquitinierung von H2AK119 (α -H2AUbi) wurden ChIP-qPCR-Experimente mit Chromatin aus HEK-Zellen (mock) sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 (WT) und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 (K/R) an L3MBTL2 Zielpromotoren durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Bereich -2000 Bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt von *CDC7*. Die Promotoren von *PHF20*, *E2F6*, *RFC1*, *RPA2* wiesen eine sehr starke Bindung durch L3MBTL2 auf, *CYP2R1*, *MFAP1*, *UXT* und *CDC7* eine starke Bindung und *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* wurden schwach durch L3MBTL2 gebunden.

Somit nimmt die SUMOylierung von L3MBTL2 weder Einfluss auf die Rekrutierung von E2F6 und RING2 noch auf die Monoubiquitinierung von H2AK119 an L3MBTL2 Zielpromotoren. In Korrelation mit der Bindungsstärke von L3MBTL2 wurden E2F6 und RING2 auch stärker an Promotoren rekrutiert, die eine starke L3MBTL2 Bindung aufwiesen. Schwach durch L3MBTL2 gebundene Promotoren zeigten auch eine schwächere Rekrutierung von E2F6 und RING2. Monoubiquitiniertes H2A wurde entgegen der Rekrutierung von RING2 verstärkt an schwach durch L3MBTL2 gebundenen Promotoren nachgewiesen (Abbildung 4.19 unten).

4.2.4 Untersuchung des Effekts der SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität von L3MBTL2

L3MBTL2 wurde in Reporter-Experimenten als transkriptioneller Repressor identifiziert (Yoo et al., 2010). Im Folgenden wurde der Effekt der SUMOylierung von L3MBTL2 auf die transkriptionelle Aktivität des MBT-Domänen Proteins untersucht.

4.2.4.1 Die SUMOylierung von L3MBTL2 zeigt keine Auswirkungen auf die Repression eines Reportergens

Um den Einfluss der SUMOylierung von L3MBTL2 auf die Expression eines Reportergens zu untersuchen, wurden wildtypisches und SUMOylierungs-defizientes L3MBTL2 als GAL4-Fusionsproteine in HEK-Zellen exprimiert. Als Reporter diente ein ebenfalls transient transfiziertes Expressionskonstrukt der Firefly-Luziferase, deren Promotor vier GAL4-Bindungsstellen besaß. Zum Ausgleich möglicher Schwankungen in der Transfektionseffizienz erfolgte die Kotransfektion eines konstitutiv aktiven Expressionskonstrukts der Renilla-Luziferase. Um die Aktivierbarkeit des Reportergens nachzuweisen, wurden die ersten 147 Aminosäuren von GAL4 exprimiert. Als Positivkontrolle der Repression diente die Expression von GAL4-L3MBTL1, dessen Funktion als transkriptioneller Repressor bereits im Rahmen eines Reporter-Experiments beschrieben wurde (Boccuni et al., 2003).

Die Analyse der Luziferase-Aktivitäten zeigte sowohl die Aktivierung (2,3-fach) des Reporters durch GAL4 (AS 1-147) als auch dessen Repression (1,7-fach gegenüber GAL4) durch GAL4-L3MBTL1 (Abbildung 4.20 A). Die Expression von GAL4-L3MBTL2 führte zu einer 2,8-fachen Repression der Firefly-Luziferase gegenüber GAL4. GAL4-L3MBTL2K/R reprimierte etwas schwächer (2,3-fach gegenüber GAL4) als das wildtypische Protein, wobei der Unterschied unter Berücksichtigung der Standardabweichung jedoch nicht signifikant war.

Abbildung 4.20 B zeigt, dass sowohl GAL4-L3MBTL2WT als auch GAL4-L3MBTL2K/R und GAL4-L3MBTL1 in ähnlicher Weise exprimiert wurden. GAL4 (AS 1-147) wurde hingegen wesentlich schwächer exprimiert. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung des Reporters bei einer vergleichbaren Expression deutlich stärker ausfiel und somit auch die repressiven Effekte insgesamt stärker wären. Die

Unterschiede der relativen Firefly-Luziferase-Aktivitäten zwischen GAL4-L3MBTL1, GAL4-L3MBTL2 und GAL4-L3MBTL2K/R blieben davon jedoch unbeeinflusst.

Zusammenfassend wirkt sich die SUMOylierung von L3MBTL2 im Rahmen von Reporter-gen-Experimenten nicht auf die transkriptionelle Aktivität des MBT-Domänen Proteins aus.

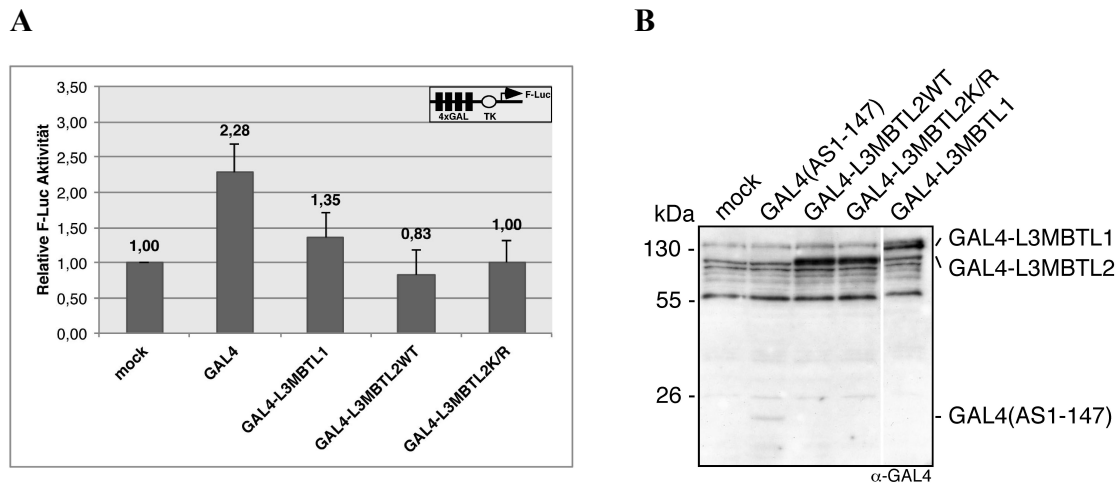


Abbildung 4.20: Die SUMOylierung von L3MBTL2 zeigt keine Auswirkungen auf die Repression eines Reportergens

A) HEK-Zellen wurden in 24-well Zellkulturplatten in Duplikaten mit je 250 ng pSG (mock), pGAL4, pGAL4-L1flwt, pGAL4-L2flwt oder pGAL4-L2flK675,700R zusammen mit je 0,5 ng pRL-SV40 und 200 ng p(UAS)4xtk-Luc transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Expression der Firefly (F-Luc)- sowie die der Renilla (R-Luc)-Luziferase mittels eines dualen Luziferase-Assays analysiert. Die F-Luc Werte wurden auf die der Renilla-Luziferase normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen F-Luc Aktivität aus drei unabhängigen Experimenten nach Doppelbestimmung. Die Standardabweichung wurde anhand der drei Mittelwerte berechnet.

Promotorschema vier GAL4-Bindungsstellen (4xGAL4) vor dem Thymidinkinase Promotor (TK), Firefly-Luziferasegen (F-Luc) **B) Expressionskontrolle der eingesetzten Konstrukte** HEK-Zellen wurden in 24-well Zellkulturplatten mit je 250 ng pSG, pGAL4, pGAL4-L2flwt, pGAL4-L2flK675,700R oder pGAL4-L1flwt transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden SDS-Gesamtzellextrakte hergestellt und je 20 μ g der Extrakte nach Auftrennung in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel durch Western Blotting mit einem α -GAL4 Antikörper analysiert.

4.2.4.2 Genomweite Expressionsanalysen zur Identifizierung durch L3MBTL2 regulierter Gene

Zur Identifizierung durch L3MBTL2 regulierter Gene und der Untersuchung des Effekts der L3MBTL2 SUMOylierung auf deren Expression wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus untransfizierten sowie 3xFLAG-L3MBTL2 oder 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R stabil exprimierenden HEK-Zellen isoliert. Nach Amplifikation und Markierung der RNA wurde die markierte anti-sense RNA mit je einem SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray von Agilent hybridisiert (durchgeführt in Kollaboration mit Dr. Michael Krause). Ein Array repräsentierte dabei rund 28000 humane Transkripte und 7500 lincRNAs (long intergenic noncoding RNAs). Die bioinformatische Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte durch Florian Finkernagel am IMT Marburg.

Zur Identifizierung durch L3MBTL2 regulierter Gene wurden die Sequenzen jeder der mit einer anti-sense RNA hybridisierten RNA-Sonden mit dem annotierten humanen Genom und Transkriptom abgeglichen und einem entsprechenden Gen zugeordnet. Das Expressionsniveau jedes identifizierten Gens wurde im Vergleich zu einer Mischung aller RNAs analysiert und als dereguliert klassifiziert, wenn eine mindestens 1,5-fache Änderung der Expression gegenüber der in untransfizierten HEK-Zellen vorlag.

Abbildung 4.21 zeigt die Gesamtheit der nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R im Vergleich zu untransfizierten HEK-Zellen deregulierten Gene. In den Tabellen A5 und A8 sind die nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R deregulierten Sonden aufgeführt. Da eine Sonde jedoch einem, mehreren oder auch keinem Gen zugeordnet werden kann, weicht die Zahl der Sonden in den Tabellen von der Zahl deregulierter Gene in Abbildung 4.21 ab. Nach Überexpression von wildtypischem L3MBTL2 wurden von insgesamt 385 deregulierten Genen 234 (61%) Gene stärker und 151 (39%) Gene schwächer exprimiert (Abbildung 4.21 links). Ein Vergleich mit den in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 ergab, dass 89 (23%) der 385 deregulierten Gene gleichzeitig durch L3MBTL2 im Bereich ihres Promotors gebunden werden (blauer Kreis) (siehe Tabellen A6 und A7). Das Verhältnis zwischen aktivierten (62%) und reprimierten

(38%), durch L3MBTL2 gebundenen, Zielgenen entsprach dabei dem der insgesamt durch die Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 deregulierten Gene.

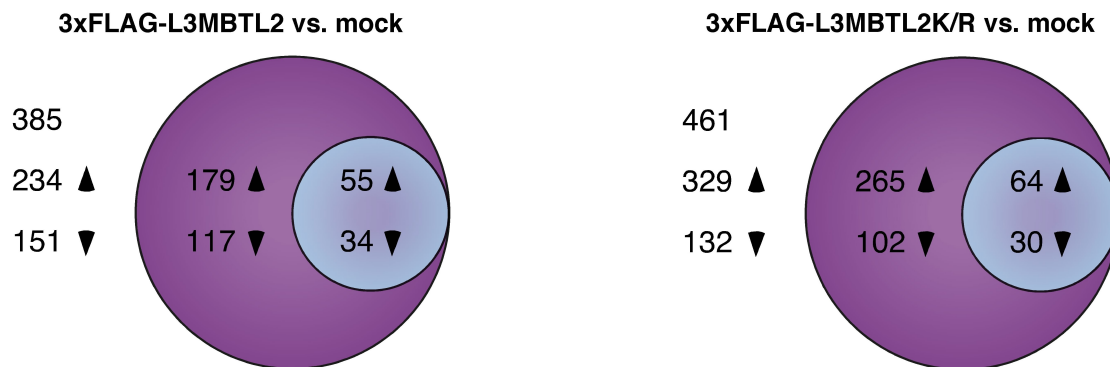


Abbildung 4.21: Identifizierung durch L3MBTL2 regulierter Gene mittels Microarray-Analysen

Gesamt-RNA aus HEK-Zellen im biologischen Duplikat sowie aus Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21, jeweils im biologischen Triplikat, wurde mithilfe des RNeasy Mini Systems von Qiagen isoliert. Je 500 ng der präparierten RNA wurde unter Verwendung des two-color Quick Amp Labeling Kits von Agilent markiert und nach Anweisung des Herstellers mit dem SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K Microarray (Agilent) hybridisiert. Dargestellt sind die nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R im Vergleich zu HEK-Zellen mindestens 1,5-fach deregulierten Gene mit einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Gene, die gleichzeitig eine Bindung von L3MBTL2 im Bereich ihres Promotors aufweisen, wurden blau hinterlegt.

Farbcodierung Deregulierte Gene ohne Promotorbindung von L3MBTL2 (lila), deregulierte Gene mit gleichzeitiger Bindung von L3MBTL2 +/- 1250 Bp zum Transkriptionsstart (blau).

Die Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R hatte die Deregulation von insgesamt 461 Genen zur Folge. Im Vergleich zur Überexpression von wildtypischem L3MBTL2 stellte dies eine um 20% erhöhte Gesamtzahl deregulierter Gene dar (Abbildung 4.21 rechts). Von den 461 durch 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R deregulierten Genen wiesen 329 (71%) eine verstärkte und 132 (29%) eine verringerte Expression auf. Der Vergleich mit den genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 zeigte für insgesamt 94 (20%) der 461 deregulierten Gene eine Bindung von L3MBTL2 im Bereich ihres Promotors (blauer Kreis) (siehe Tabellen A9 und A10). Die Zahl aktivierter, durch L3MBTL2 gebundener, Gene (64) war dabei gegenüber der nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 (55) um 16% erhöht. Der Anteil reprimierter Zielgene war dagegen um 12% verringert. Ein Vergleich der durch

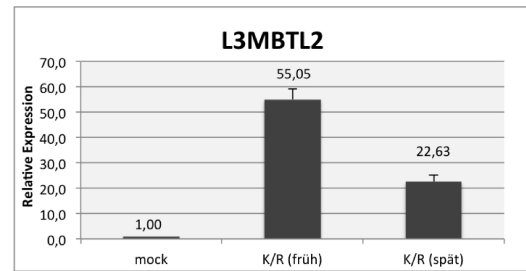
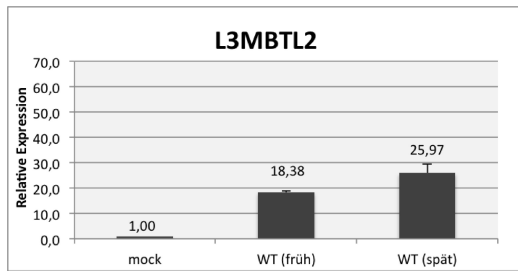
3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R deregulierten und durch L3MBTL2 gebundenen Zielgene identifizierte nur ein Gen, das durch 3xFLAG-L3MBTL2 reprimiert und durch 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R aktiviert wurde. Das entsprechende Gen kodiert für die lincRNA *RP4-564F22.2*.

Die funktionale Analyse aller deregulierten Gene ergab ein sehr heterogenes Ergebnis. Dabei war für keine der Gruppen eine signifikante Anreicherung feststellbar (Benjaminiwerte $>0,05$). Durch 3xFLAG-L3MBTL2 aktivierte Gene wurden biologischen Prozessen wie „Anordnung zellulärer Bestandteile“ oder „Fettsäureoxidation“ zugeordnet, reprimierte Gene fanden sich in Gruppen wie „Regulation zellulärer Prozesse“ und „Zellkommunikation“. Die durch 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R aktivierten Gene zählten zu biologischen Prozessen wie „Benzolmetabolismus“ oder „Neurotransmittersekretion“, die reprimierten Gene wurden Gruppen wie „Lungenentwicklung“ und „Regulation der Zellteilung“ zugeteilt.

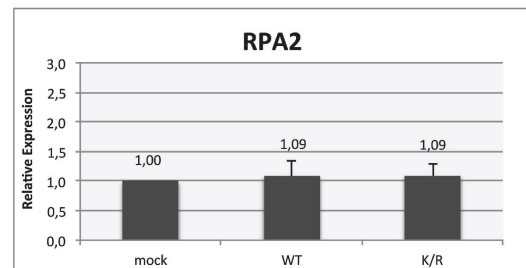
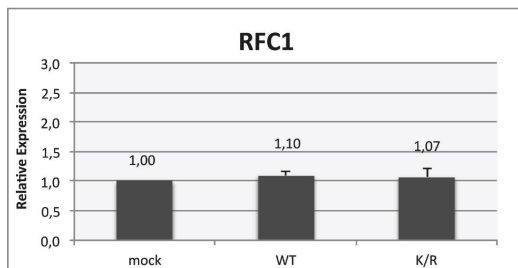
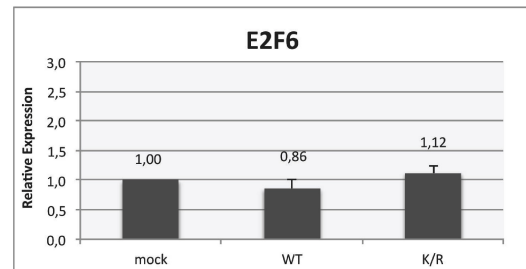
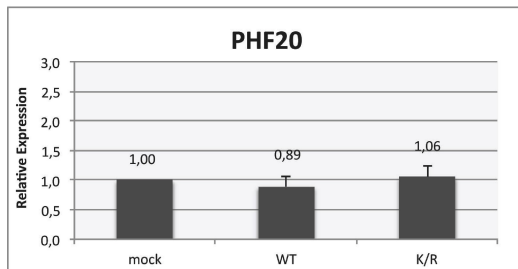
4.2.4.3 Die SUMOylierung von L3MBTL2 führt zur Repression schwach durch L3MBTL2 gebundener Gene

Um die Aussagekraft der Microarray-Analysen zu verstärken, wurden Validierungsexperimente in Form von RT-qPCR Analysen von Dr. Bastian Stielow durchgeführt. Diese wurden zur Vervollständigung der Ergebnisse in diese Arbeit mit aufgenommen. Abbildung 4.22 zeigt die Expression ausgewählter Gene in 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R exprimierenden Zellen als Mittelwerte aus mindestens zwei biologischen Replikaten relativ zur Expression in untransfizierten HEK-Zellen. Die Auswahl der Gene erfolgte entsprechend der in Abschnitt 4.2.3 identifizierten promotornahen Bindungsstellen von L3MBTL2. Dabei wurde zwischen Zielgenen mit einer sehr starken (1-2% Input) (Abbildung 4.22 B), starken (0,2-0,5% Input) (Abbildung 4.22 C) und einer schwachen ($<0,2\%$ Input) (Abbildung 4.22 D) Rekrutierung von L3MBTL2 unterschieden (siehe auch Abbildung 4.18).

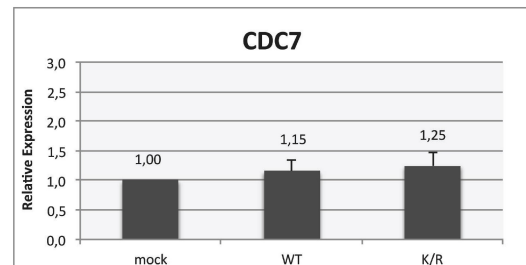
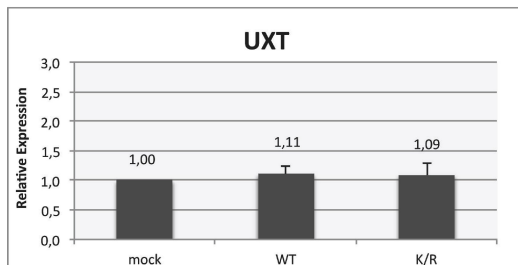
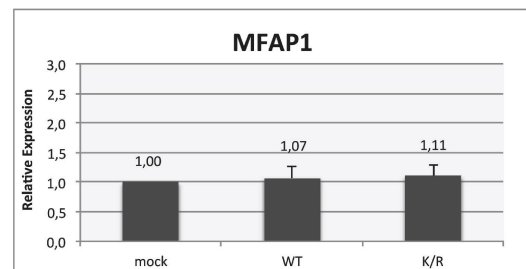
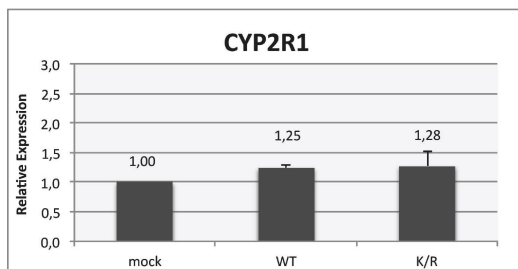
A



B



C



D

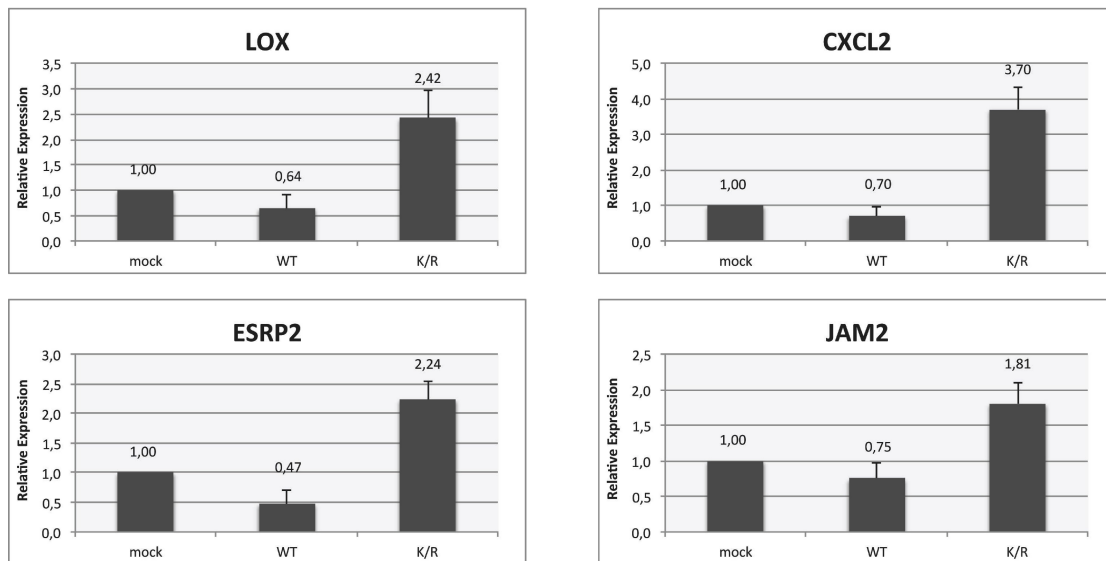


Abbildung 4.22: Die SUMOylierung von L3MBTL2 führt zur Repression schwach durch L3MBTL2 gebundener Gene

Gesamt-RNA aus HEK-Zellen (mock) sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 (WT) und HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 (K/R) wurde mithilfe des RNeasy Mini Systems von Qiagen isoliert. Je 2 µg der präparierten Gesamt-RNA wurde für das Umschreiben der mRNA in cDNA mittels Oligo(dT) Primern eingesetzt. Die cDNA wurde 1:20 verdünnt und je 1 µl der Verdünnung als Template für eine quantitative PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR erfolgte mit mindestens zwei biologischen Replikaten in Triplikaten. Die erhaltenen Werte wurden auf die für *GAPDH* oder *B2M* normalisiert und als Mittelwert relativ zur Expression im Kontext von endogenem L3MBTL2 (mock) dargestellt. Die Standardabweichung wurde anhand aller Replikate berechnet. **A)** Kontrolle der Expression von L3MBTL2 in frühen und späten Passagen **B)** Expression sehr stark von L3MBTL2 gebundener Gene **C)** Expression stark von L3MBTL2 gebundener Gene **D)** Expression schwach von L3MBTL2 gebundener Gene.

Da RNA aus Zellen verschiedener Passagen als Ausgangsmaterial der Validierungsexperimente diente, wurde zunächst die Expression von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R im Vergleich zu endogenem L3MBTL2 untersucht (Abbildung 4.22 A). 3xFLAG-L3MBTL2 zeigte gegenüber endogenem L3MBTL2 eine 18- bis 26-fach stärkere Expression (Abbildung 4.22 links). 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wurde in einer frühen Passage 55-fach stärker als endogenes L3MBTL2 exprimiert. Das weitere Passagieren führte jedoch zum langsamen Abschalten des Promotors, wodurch in einer späteren Passage nur noch eine 23-fache Überexpression feststellbar war (Abbildung 4.22 A rechts). Im Rahmen der Microarray-Analysen zeigte L3MBTL2 nach Überexpression von 3xFLAG-

L3MBTL2 eine 14-fache Aktivierung (siehe Tabellen A5 und A6). Die Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R hatte eine 12-fach verstärkte Expression zur Folge (siehe Tabellen A8 und A9).

Die Analyse von *PHF20*, *E2F6*, *RFC1* und *RPA2* ergab, dass deren Expression unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht durch die Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 oder 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R beeinflusst wurde (Abbildung 4.22 B). *PHF20*, *E2F6*, *RFC1* und *RPA2* wiesen alle eine sehr starke Rekrutierung von L3MBTL2 auf und wurden im Microarray nicht als deregulierte Gene identifiziert.

Die Expression der stark von L3MBTL2 gebundenen Gene *CYP2R1*, *MFAP1*, *UXT* und *CDC7* wies nach Überexpression von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 ebenfalls keine signifikant veränderte Expression gegenüber untransfizierten HEK-Zellen auf (Abbildung 4.22 C). Dies entsprach den Ergebnissen der Microarray-Analysen.

Eine deutliche Deregulation zeigte sich für die schwach durch L3MBTL2 gebundenen Gene *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* (Abbildung 4.22 D, siehe Tabelle A8). In allen Fällen führte die Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 zu einer 1,3- bis 2-fachen Repression. Die Expression der SUMOylierungs-defizienten Mutante von L3MBTL2 hatte hingegen eine 1,8- bis 3,7-fache Derepression der Gene zur Folge. *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* wurden für die Validierungsexperimente ausgewählt, da für alle vier Gene im Microarray eine verstärkte Expression infolge der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R nachgewiesen wurde. Die visuelle Inspektion der entsprechenden Promotoren zeigte zudem, dass alle vier Gene eine schwache Rekrutierung von L3MBTL2 aufwiesen. Dabei erreichte jedoch nur der Peak am *LOX*-Promotor den für die ChIP-Seq-Analysen angelegten Schwellenwert einer FDR <0,001. Aus diesem Grund sind *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* weder in Tabelle A3 noch in Tabelle A9 zu finden. Im Microarray wiesen *LOX*, *CXCL2* und *ESRP2* eine 1,7- bis 2,8-fache Aktivierung durch 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R auf. Für *JAM2* zeigte hingegen sowohl die Expression von wildtypischem als auch die von SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 eine 1,5- bis 1,6-fache Aktivierung.

Zusammenfassend wurde SUMOyliertes L3MBTL2 als Repressor solcher Zielgene identifiziert, die im Bereich ihres Promotors in geringem Maße durch L3MBTL2 gebunden werden.

4.3 Auswirkungen der Konservierung der proteomweiten SUMOylierung auf die Stabilität von Proteinkomplexen

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit SUMO vermittelt unter anderem die Ausbildung SUMO-abhängiger Protein Interaktionen über nicht kovalente Wechselwirkungen mit spezifischen SUMO-Interaktionsmotiven (Ivanov et al., 2007; Kerscher, 2007; de la Vega et al., 2011). Die Konjugation von SUMO kann jedoch ebenso eine Interaktion zwischen Proteinen verhindern (Zheng and Yang, 2004). Aufgrund der damit verbundenen Vielfalt möglicher SUMO-abhängiger Wechselwirkungen kann vermutet werden, dass sich die Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen in Abhängigkeit der SUMOylierung einzelner Komplexkomponenten verändert. Basierend auf dieser Hypothese wurden die Auswirkungen der Konservierung der proteomweiten SUMOylierung auf die Integration von L3MBTL2 in Multiproteinkomplexe mittels Gelfiltration untersucht.

4.3.1 Unmodifiziertes L3MBTL2 ist in Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts nachweisbar

L3MBTL2 wurde als Bestandteil des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002) und PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) Komplexes beschrieben. Beide Komplexreinigungen fanden unter Bedingungen statt, die den Verlust der SUMOylierung modifizierter Komplexkomponenten durch SUMO-spezifische Isopeptidasen erlaubten. Aus diesem Grund wurde der Effekt der Konservierung der proteomweiten SUMOylierung auf die Integration von L3MBTL2 in Multiproteinkomplexe mittels Gelfiltration untersucht.

Als Grundlage zur Untersuchung des Effekts der SUMOylierung diente die Analyse von unmodifiziertem endogenem L3MBTL2. Dafür wurden Kernextrakte aus untransfizierten HEK-Zellen in einer Superose 6 Säule aufgetrennt und das Elutionsprofil von L3MBTL2 mittels Western Blotting bestimmt. Abbildung 4.23 A (oben) zeigt, dass sich die Elution von L3MBTL2 über viele Fraktionen erstreckte, wobei eine Anreicherung des Proteins in den Fraktionen 20 bis 22 ($M_r \approx 1,4$ MDa) sowie 31 und 32 ($M_r \approx 160$ kDa) auftrat. In Übereinstimmung mit den publizierten Daten demonstriert das verstärkte Signal im Bereich von 1,4 MDa die stabile Assoziation von unmodifiziertem L3MBTL2 mit Multiproteinkomplexen. Das theoretische Molekulargewicht von monomerem L3MBTL2 liegt bei 79 kDa. Dies

entspräche einem Signal in Fraktion 33. Da neben dem Molekulargewicht jedoch auch die Tertiärstruktur eines Proteins dessen Laufverhalten im Rahmen einer Gelfiltration beeinflusst, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Anreicherung in den Fraktionen 31 und 32 um monomeres L3MBTL2 handelte.

Neben L3MBTL2 wurde auch das Laufverhalten von Sp3 untersucht (Abbildung 4.23 A unten). Das theoretische Molekulargewicht von Sp3 beträgt 82 kDa. Sp3 wurde ebenfalls in mehreren Fraktionen von der Säule eluiert, wobei eine deutliche Trennung zwischen den langen (Fraktionen 26-29) und kurzen (Fraktionen 30-32) Isoformen auftrat. Sp3 wurde bislang nicht als Bestandteil stabiler Proteinkomplexe beschrieben. Daher konnte anhand der hier durchgeführten Gelfiltration nicht abschließend geklärt werden, ob das beobachtete Elutionsprofil infolge der räumlichen Struktur von Sp3 oder einer Assoziation mit stabilen Proteinkomplexen auftrat.

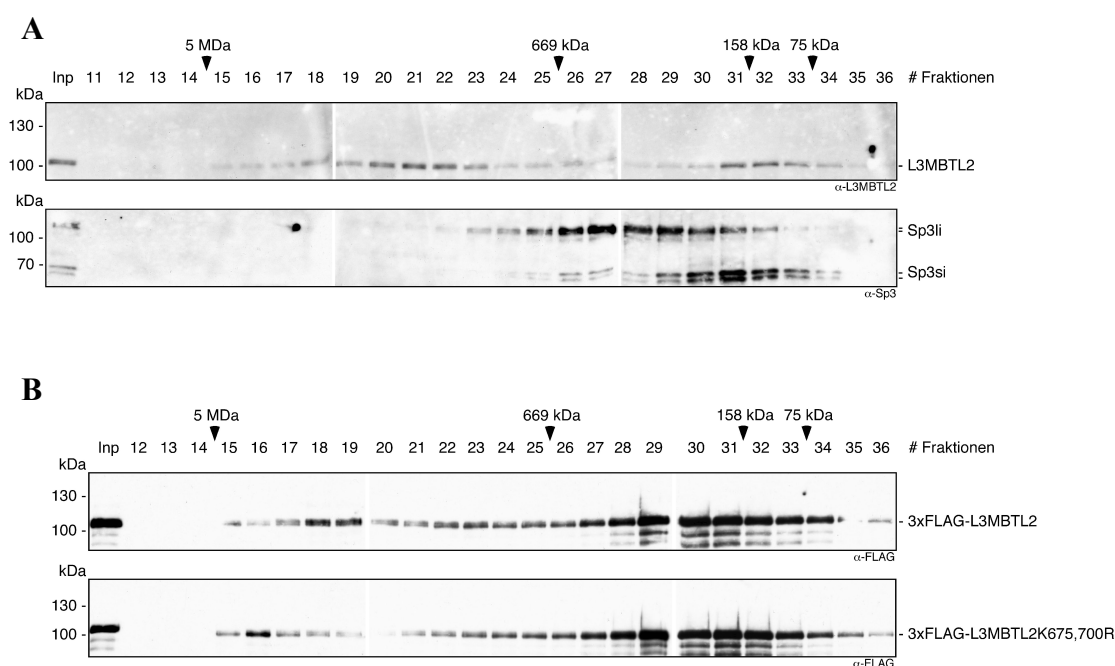


Abbildung 4.23: L3MBTL2 ist in Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts nachweisbar

A) Gelfiltration zur Analyse des Elutionsprofils von endogenem L3MBTL2 Ca. 570 µg HEK-Kernextrakt wurde in einer Superose 6 Säule aufgetrennt und das Eluat in 36 Fraktionen von je 500 µl gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe von je 5 µl StrataClean Beads konzentriert und gebundene Proteine bzw. Proteinkomplexe durch Zugabe von je 20 µl 2x Laemmli-Puffer denaturiert. Nach Auftrennung in 6%-igen SDS-PAA-Gelen wurden die Elutionsprofile von endogenem L3MBTL2 und Sp3 durch Western Blotting analysiert. Input: 1% der auf die Säule applizierten Proteinmenge

B) Gelfiltration zur Analyse der Elutionsprofile von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Ca. 440 µg Kernextrakt aus Zellen der Linie HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 bzw. ca. 460 µg aus Zellen der Linie HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 1 wurden wie in A einer Gelfiltration unterzogen. Von 36 Fraktionen wurde jeweils die Hälfte einer Fraktion in 6%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und die Elutionsprofile von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R nach Western Blotting mithilfe eines α -FLAG Antikörpers untersucht. Input: 1% der auf die Säule applizierten Proteinmenge.

Um zu untersuchen, ob 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R ein ähnliches Elutionsprofil wie endogenes L3MBTL2 aufweisen, wurden Gelfiltrationen nach Überexpression der beiden 3xFLAG-Fusionsproteine durchgeführt (Abbildung 4.23 B). 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wurden wie endogenes L3MBTL2 in allen Fraktionen von der Säule eluiert. Beide 3xFLAG-Fusionsproteine zeigten jedoch eine im Vergleich zu endogenem L3MBTL2 um zwei Fraktionen hin zu höheren Molekulargewichten verschobene maximale Anreicherung (Fraktionen 29-32). Daneben waren für 3xFLAG-L3MBTL2 verstärkte Signale in den Fraktionen 18 und 19 nachweisbar. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wies dagegen in Fraktion 16 ein verstärktes Signal auf. Ob es sich hierbei um einen realen Unterschied oder eine Variationen in der Versuchsdurchführung handelte, konnte auch in einer weiteren Gelfiltration nicht abschließend geklärt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend demonstrierten die Elutionsprofile von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R die Assoziation der Proteine mit stabilen hochmolekularen Proteinkomplexen, wobei sich die Fraktionen maximaler Anreicherung voneinander unterschieden.

4.3.2 Stabilisierung hochmolekularer Proteinkomplexe durch die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung

Um den Einfluss der SUMOylierung auf die Integration von L3MBTL2 in hochmolekulare Proteinkomplexe zu untersuchen, wurden Kernextrakte aus untransfizierten sowie 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R exprimierenden HEK-Zellen mittels Gelfiltration analysiert. Die Extraktpräparation erfolgte unter Zugabe von N-Ethylmaleinimide (NEM), welches durch die

Alkylierung von Thiolgruppen unter anderem SUMO-spezifische Cysteinpeptidasen inaktiviert (Gorin et al., 1966).

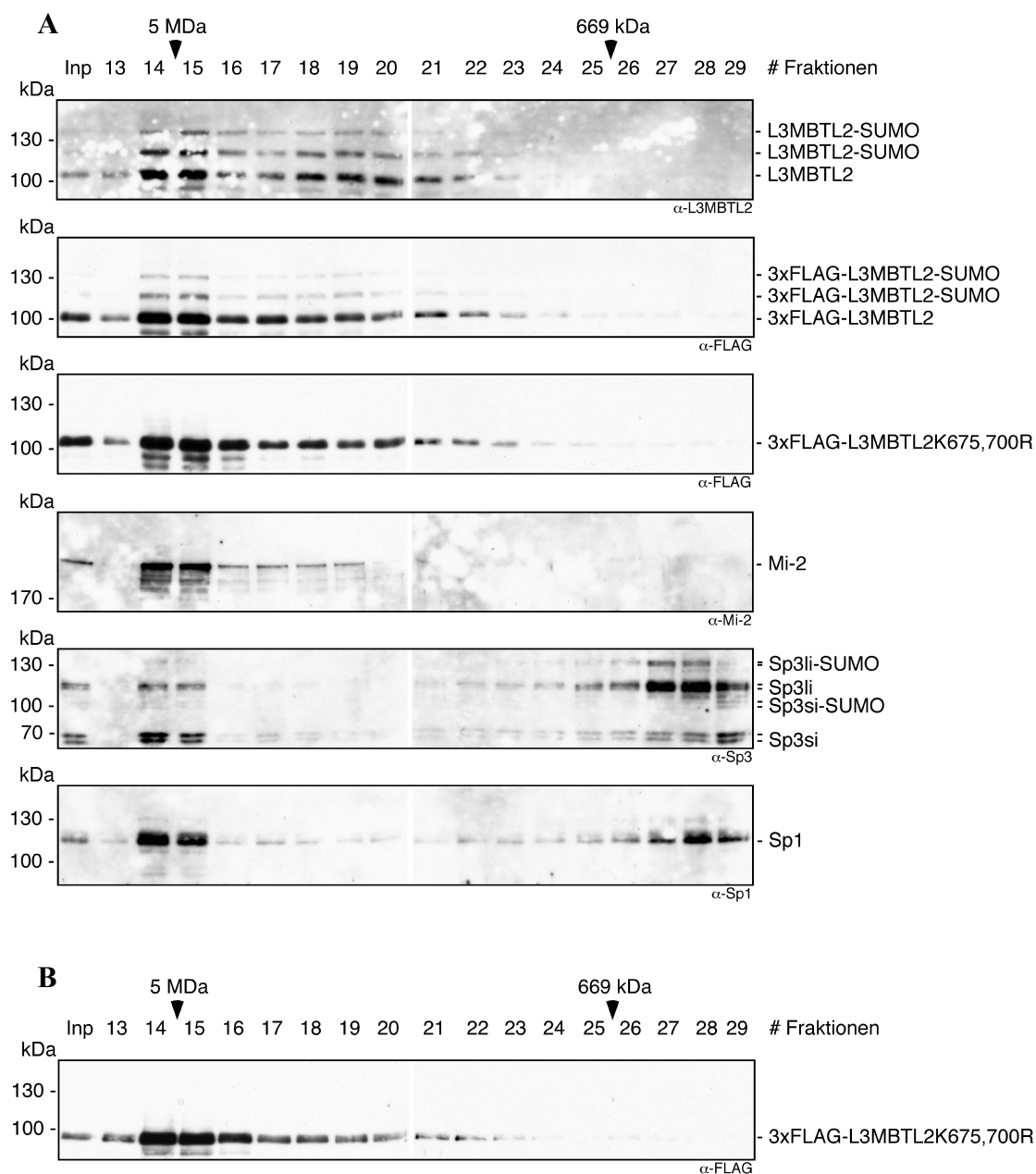


Abbildung 4.24: Die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung führt zu einer Stabilisierung hochmolekularer Proteinkomplexe

A) Ca. 570 μ g Kernextrakt (+ 20 mM NEM) aus HEK-Zellen bzw. ca. 450 μ g aus Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 oder HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 1 wurden in einer Superose 6 Säule aufgetrennt. Es folgte die Elution in 29 Fraktionen von je 500 μ l, die mithilfe von je 5 μ l StrataClean Beads konzentriert und präzipitierte Proteine bzw. Proteinkomplexe durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer denaturiert wurden. Nach Auftrennung in 6%-igen SDS-PAA-Gelen

wurden die Elutionsprofile von endogenem L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R nach Western Blotting mittels α -L3MBTL2 bzw. α -FLAG Antikörpern analysiert. Die Gelfiltration der Kernextrakte aus 3xFLAG-L3MBTL2 exprimierenden Zellen diente ebenfalls zur Untersuchung der Elutionsprofile von Mi-2, Sp3 und Sp1 mittels spezifischer Antikörper. Input: 1% der auf die Säule applizierten Proteinmenge **B**) Kernextrakt (+ 20 mM NEM) aus Zellen der Linie HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 1 wurde auf 150 mM NaCl verdünnt und nach Zugabe von 50 U Benzonase für zwei Stunden auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Ca. 240 μ g des behandelten Extrakts wurden in einer Superose 6 Säule aufgetrennt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in A). Input: 1,25% der auf die Säule applizierten Proteinmenge.

Abbildung 4.24 A (oben) zeigt, dass die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung zu einer drastischen Verschiebung der Signale von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R hin zu Fraktionen des maximal noch trennbaren Molekulargewichts führte. Ein Vergleich der Elutionsprofile von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R mit Abbildung 4.23 B machte deutlich, dass sich die in Abwesenheit von NEM ab Fraktion 27 aufgetretene starke Anreicherung beider 3xFLAG-Fusionsproteine durch die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung in ihrer Gesamtheit hin zu hochmolekularen Fraktionen verschob. Das Elutionsmaximum wurde dabei sowohl für 3xFLAG-L3MBTL2 als auch für 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R bereits in den Fraktionen 14 und 15 erreicht. Dieser Effekt trat unabhängig von der L3MBTL2 SUMOylierung auf, da sich das Elutionsprofil der SUMOylierungs-defizienten Mutante in gleicher Weise veränderte (Abbildung 4.24 A Mitte). Die in Abbildung 4.23 B beobachtete Anreicherung von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R in voneinander abweichenden hochmolekularen Fraktionen war unter diesen Bedingungen nicht erkennbar. Nur im Fall des endogenen Proteins deutete ein Vergleich des Elutionsprofils mit dem aus Abbildung 4.23 A darauf hin, dass auch nach Konservierung der SUMOylierung die Anreicherung im Bereich von Fraktion 20 bestehen blieb.

Um auszuschließen, dass es sich bei der drastischen Verschiebung der Signale von L3MBTL2 um einen durch NEM hervorgerufenen Effekt handelte, wurden auch die Elutionsprofile von Mi-2, Sp3 und Sp1 untersucht (Abbildung 4.24 A unten). Aufgrund publizierter Daten einer Gelfiltration nukleärer Extrakte aus HeLa-Zellen mittels einer Superose 6 Säule wurde die Elution von Mi-2 zwischen 2 MDa und 670 kDa erwartet (Feng and Zhang, 2001). Entgegen dieser Erwartungen wurde das

Elutionsmaximum von Mi-2 nach Konservierung der proteomweiten SUMOylierung im Bereich von 5 MDa nachgewiesen (Abbildung 4.24 A Mitte).

Ohne Zugabe von NEM zeigte das Elutionsprofil von Sp3 abhängig von den jeweiligen Isoformen Signale zwischen 669 kDa und 75 kDa (Abbildung 4.23 A unten). Die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung führte im Gegensatz zu L3MBTL2 und Mi-2 nur zu einer partiellen Verschiebung des Sp3 Signals hin zu hochmolekularen Fraktionen (Abbildung 4.24 A unten). Dabei war auffällig, dass vor allem die beiden kurzen Isoformen von Sp3 im Bereich mehrerer Megadalton nachgewiesen wurden. Sp1 zeigte nach Zugabe von NEM ein ähnliches Elutionsprofil wie Sp3, wobei für Sp1 etwas stärkere Signale im hochmolekularen Bereich auftraten (Abbildung 4.24 A unten). Die partielle Verschiebung der Elutionsprofile von Sp3 und Sp1 könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit ihrer eigenen oder der SUMOylierung interagierender Proteine partiell mit stabilen Proteinkomplexen assoziiert sind.

Um neben einem SUMO-unabhängigen NEM-Effekt auch die mögliche Beeinflussung der Komplexgröße durch Interaktionen mit DNA oder RNA auszuschließen, erfolgte exemplarisch eine Gelfiltration mit Benzonase-behandeltem Kernextrakt. Das Elutionsprofil von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R (Abbildung 4.24 B) entsprach dem der Gelfiltration ohne Benzonasebehandlung (Abbildung 4.24 A Mitte). Folglich ist die Verschiebung der Elutionsprofile von L3MBTL2, Mi-2, Sp3 und Sp1 vermutlich nicht auf eine Assoziation der Proteine mit DNA oder RNA zurückzuführen. Vielmehr kann angenommen werden, dass die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung hochmolekulare Proteinkomplexe stabilisiert.

4.4 Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von SUMOyliertem L3MBTL2

L3MBTL2 wurde zusammen mit E2F6, MGA, MAX, HP1 γ , DP1, Eu-HMTase1, G9A, RING1, RING2, PCGF6 und YAF2 als stabiler Bestandteil des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002) und PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) Komplexes beschrieben. Beide Komplexreinigungen fanden unter Bedingungen statt, die den Verlust der SUMOylierung modifizierter Komplexkomponenten durch SUMO-spezifische Isopeptidasen erlaubten. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der L3MBTL2 SUMOylierung auf bekannte Interaktionen untersucht und durch Aufreinigung

L3MBTL2-enhaltender Komplexe neue Interaktionspartner von L3MBTL2 durch Massenspektrometrie identifiziert.

4.4.1 Untersuchung des Einflusses der SUMOylierung von L3MBTL2 auf die Interaktion mit bekannten Komplexpartnern

Um Interaktionen zwischen L3MBTL2 und bekannten Komplexpartnern in Abhängigkeit der L3MBTL2 SUMOylierung zu untersuchen, wurden α -FLAG Immunpräzipitationen mit NEM-behandelten Kernextrakten aus untransfizierten sowie 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R stabil exprimierenden HEK-Zellen durchgeführt. Präzipitierte Proteinkomplexe wurden eluiert und ausgewählte Komplexkomponenten nach Western Blotting auf eine spezifische Interaktion mit wildtypischem oder SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 hin untersucht.

Abbildung 4.25 (oben) zeigt die Immunpräzipitation von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R im Vergleich zu untransfizierten HEK-Zellen. Unter den gewählten Bedingungen erfolgte die spezifische Präzipitation beider 3xFLAG-Fusionsproteine, wogegen endogenes L3MBTL2 vollständig im Überstand verblieb. Somit wurde sichergestellt, dass die Untersuchung 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R-enhaltender Komplexe nicht durch endogenes L3MBTL2 verfälscht wurde.

Die Analyse der mit wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 kopräzipitierten Proteine bestätigte die Interaktion von L3MBTL2 mit RING2, E2F6, HP1 γ und G9a (Abbildung 4.25 Mitte). Die Interaktionen erfolgten jedoch unabhängig von der L3MBTL2 SUMOylierung, da RING2, E2F6, HP1 γ und G9a auch im Komplex mit 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R nachgewiesen wurden. Als Negativkontrolle diente die Analyse von Sp3 und Sp2. In beiden Fällen trat weder eine Interaktion mit wildtypischem noch mit SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 auf (Abbildung 4.25 unten).

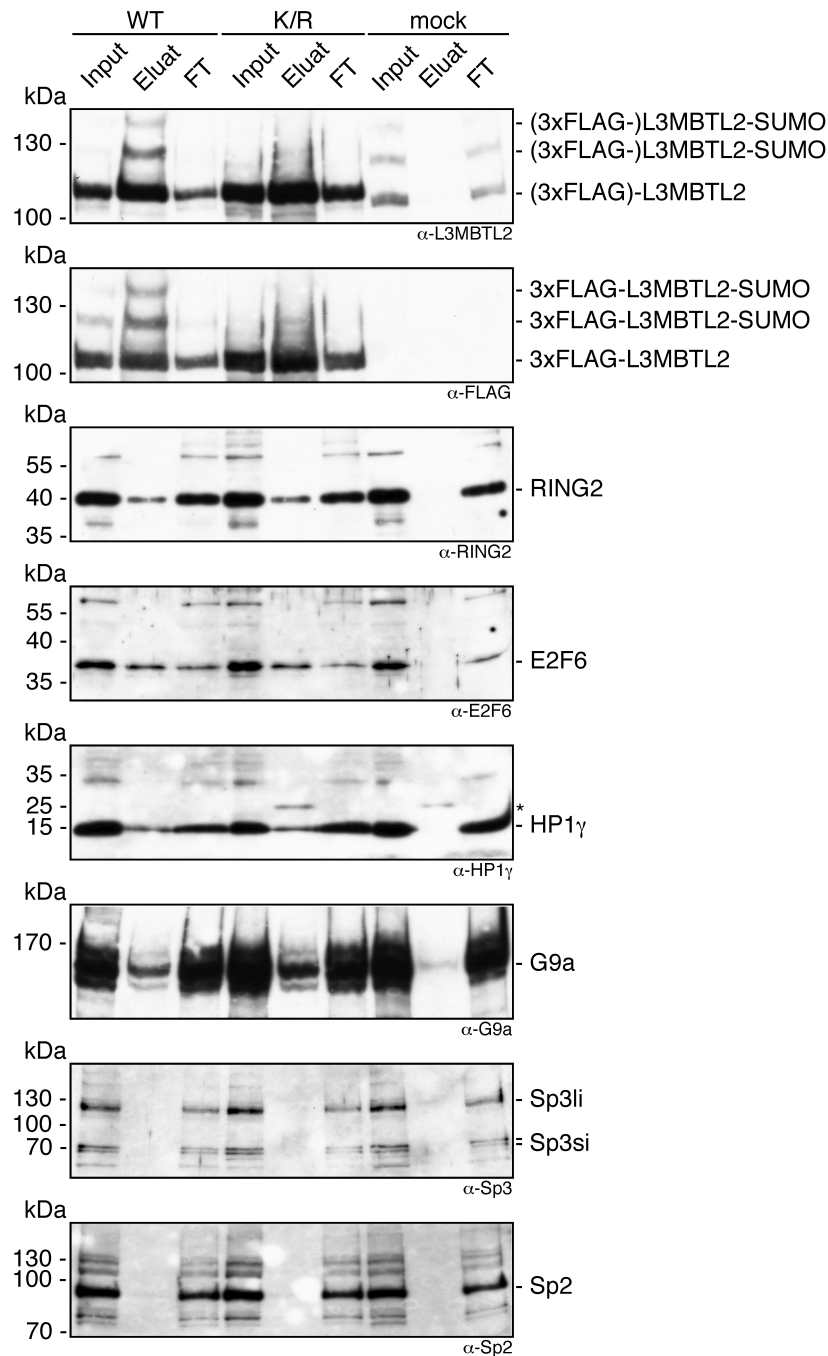


Abbildung 4.25: Die Interaktion von L3MBTL2 mit bekannten Komplexpartnern ist unabhängig von der L3MBTL2 SUMOylierung

750 μ g Kernextrakt (+NEM) aus HEK-Zellen (mock) sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 (WT) bzw. HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 (K/R) wurden nach Preclearing mit je 20 μ l α -FLAG M2 Agarose für drei Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Gebundene Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden durch die sechsmalige Inkubation mit je 2 μ g 3xFLAG-Peptid für 30 min bei 1000 UpM und 4 °C von der Matrix eluiert. Die einzelnen Elutionen wurden mit 5x Laemmli Puffer versetzt, in 6%igen (α -L3MBTL2, α -FLAG, α -G9a) bzw. 10%igen (α -RING2, α -E2F6, α -HP1 γ , α -Sp3, α -Sp2) SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und durch Western Blotting

analysiert. Input: 4% der für jede IP eingesetzten Proteinmenge, FT: 2% des Überstandes nach Immunpräzipitation. * Leichte Kette des denaturierten α -FLAG Antikörpers.

4.4.2 Aufreinigung L3MBTL2-enhaltender Komplexe und Identifizierung assoziierter Proteine durch Massenspektrometrie

Zur Identifizierung SUMO-abhängiger Interaktionspartner von L3MBTL2 wurden L3MBTL2-enhaltende Komplexe isoliert und assoziierte Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert. Dazu wurden je 60 mg NEM-behandelten Kernextrakts aus untransfizierten sowie 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R stabil exprimierenden HEK-Zellen mit Benzonase inkubiert und in einer Anionenaustauschchromatographie mithilfe einer HiTrap Q FF Säule aufgetrennt. Die L3MBTL2-enhaltenden Fraktionen wurden in einem weiteren Reinigungsschritt einer α -FLAG Immunpräzipitation unterzogen und präzipitierte Proteine nach Elution mittels 3xFLAG-Peptiden durch Massenspektrometrie identifiziert.

Um zu ermitteln, bei welchen KCl-Konzentrationen 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R von der Anionenaustauscher-Säule eluieren, wurden Säulenläufe mit je 1,5 mg NEM- und Benzonase-behandelten Kernextrakten durchgeführt. Die stufenweise Erhöhung der KCl-Konzentration zeigte, dass während des Beladens der Säule in Gegenwart von 100 mM KCl beide 3xFLAG-Fusionsproteine nahezu vollständig an das Säulenmaterial banden (Abbildung 4.26 A). Die Elution erfolgte sowohl für wildtypisches als auch für SUMOylierungs-defizientes 3xFLAG-L3MBTL2 bei KCl-Konzentrationen zwischen 250 mM und 550 mM. Das Elutionsmaximum trat in beiden Fällen bei 400 mM KCl auf (Abbildung 4.26 A). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Säulen zur Aufreinigung L3MBTL2-enhaltender Komplexe mit 100 mM KCl beladen, mit 200 mM KCl gewaschen und L3MBTL2-enhaltende Komplexe mit 550 mM KCl eluiert (Abbildung 4.26 B). Die Analyse der Fraktionen mittels Western Blotting zeigte, dass endogenes L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R in Gegenwart von 550 mM KCl erfolgreich von der Säule eluiert wurden. Wildtypisches und SUMOylierungs-defizientes 3xFLAG-L3MBTL2 wiesen dabei Signale vergleichbarer Intensität auf.

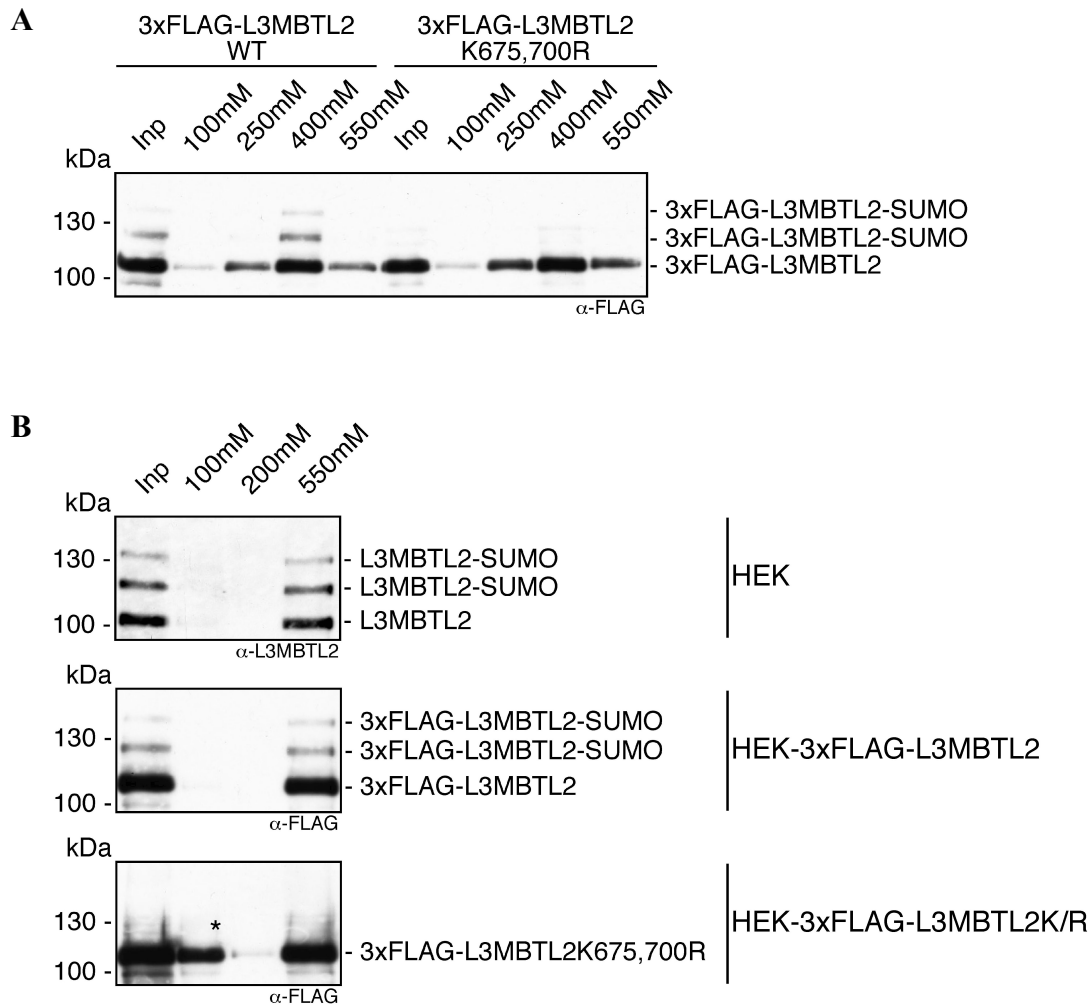


Abbildung 4.26: Aufreinigung L3MBTL2-enhaltender Proteinkomplexe mittels Anionenaustauschchromatographie

A) Je 1,5 mg Kernextrakt (+NEM) aus Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 bzw. HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 wurden mit 0,05 U/μl Benzonase behandelt und für eine Anionenaustauschchromatographie mittels einer HiTrap Q FF (1 ml) Säule eingesetzt. Die Beladung erfolgte mit 5 ml Puffer in Gegenwart von 100 mM KCl, die Elutionen mit je 5 ml Puffer der KCl-Konzentrationen 250 mM, 400 mM und 550 mM. Von jeder Elutionsstufe wurden 500 μl (10%) mithilfe von 20 μl StrataClean Beads konzentriert und nach Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel durch Western Blotting analysiert. Input: 1,5% der auf die Säule applizierten Proteinmenge. **B)** Je 60 mg Kernextrakt (+NEM) aus HEK-Zellen sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 bzw. HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 wurden wie in A mithilfe einer HiTrap Q FF (5 ml) Säule aufgetrennt. Die Beladung erfolgte in Gegenwart von 100 mM KCl, das Waschen der Säule mit 200 mM und die Elution mit 550 mM KCl, wobei jeweils Fraktionen von 30 ml gesammelt wurden. 0,06% jeder Fraktion wurden nach Auftrennung in einem 6%-igen SDS-PAA-Gel durch Western Blotting analysiert. Input: 0,06% der auf die Säule applizierten Proteinmenge. * Durch

Überschreiten der Bindungskapazität nicht an die Säule gebundener Anteil von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R.

Zur weiterführenden Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Komplexe wurden die in Gegenwart von 550 mM KCl eluierten Fraktionen einer α -FLAG Immunpräzipitation mit anschließender 3xFLAG-Peptid-Elution unterzogen. Um die Ausbeute präzipitierter Proteine zu erhöhen, diente der Überstand einer ersten IP als Ausgangsmaterial einer weiteren. Im Anschluss wurden alle Eluate der beiden IPs vereinigt und konzentriert. Abbildung 4.27 A zeigt die spezifische Immunpräzipitation von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R, wogegen endogenes L3MBTL2 vollständig in den Überständen verblieb.

Um nach zweifacher Reinigung die Integrität L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe zu überprüfen, wurde ein Teil der Eluate mittels Gelfiltration untersucht (Abbildung 4.27 B). Die Analyse der Fraktionen zwölf bis neunzehn zeigte, dass 3xFLAG-L3MBTL2 sowie 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R auch nach der zweifachen Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie und α -FLAG IP weiterhin mit stabilen hochmolekularen Komplexen assoziiert sind (Abbildung 4.27 B). In Fraktionen niederen Molekulargewichts waren dagegen keinerlei Signale detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Neben der Komplexintegrität wurde auch die Assoziation der nach zweifacher Reinigung isolierten Proteinkomplexe mit RING2, E2F6, HP1 γ und G9a untersucht (Abbildung 4.28). Wie bereits nach der einfachen Reinigung mittels α -FLAG IP (Abbildung 4.25) zeigte sich eine deutliche Interaktion von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R mit RING2 und G9a. Die Detektion von E2F6 und HP1 γ ergab verglichen mit Abbildung 4.25 deutlich schwächere Signale (Abbildung 4.28 Mitte). Die Untersuchung einer Assoziation von Sp1 mit L3MBTL2-enthaltenden Proteinkomplexen zeigte eine Interaktion sowohl mit wildtypischem als auch mit SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 (Abbildung 4.28 unten). Diese Beobachtung stand im Einklang mit der bereits durch Gelfiltration nachgewiesenen partiellen Assoziation von Sp1 mit stabilen hochmolekularen Proteinkomplexen (Abbildung 4.24 A). Als Negativkontrollen dienten Sp2 und der Transkriptionsfaktor YY1, die weder eine Interaktion mit wildtypischem noch mit SUMOylierungs-defizientem 3xFLAG-L3MBTL2 zeigten (Abbildung 4.28 unten).

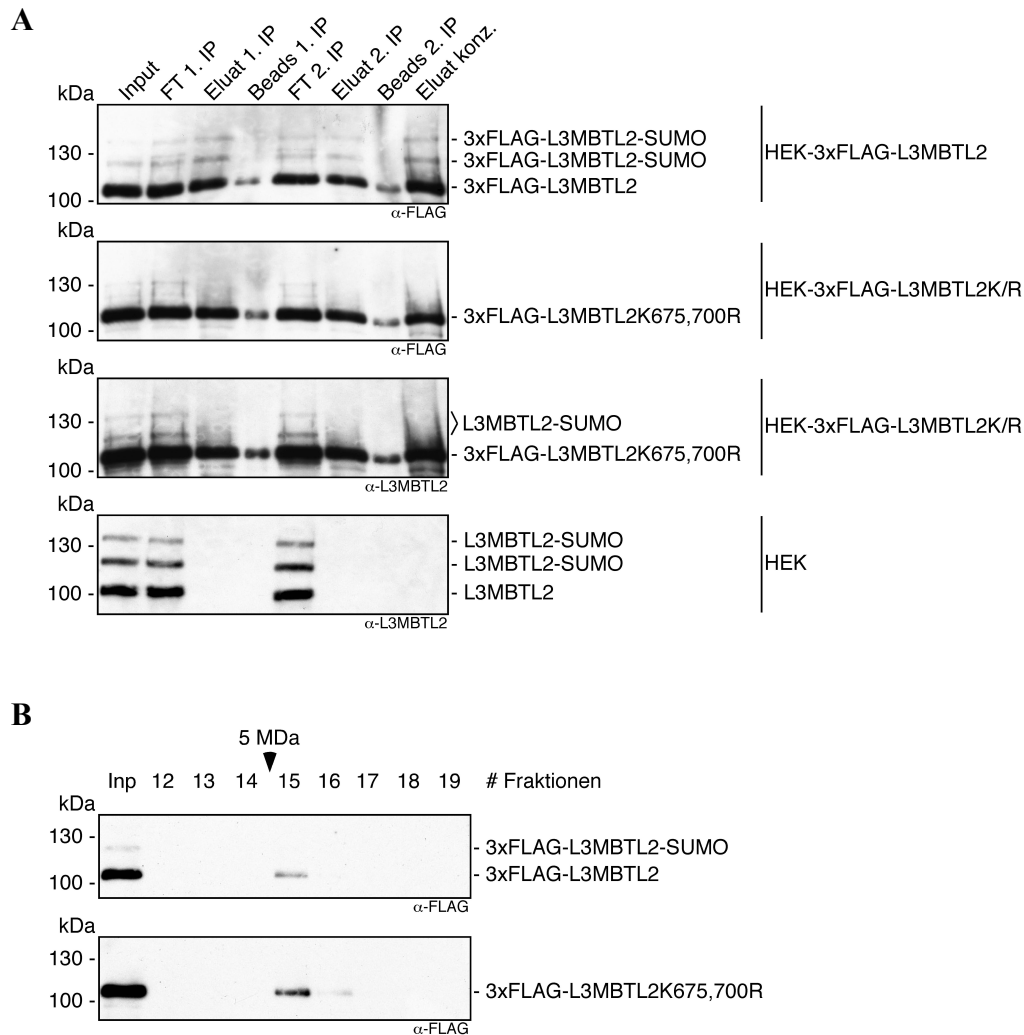


Abbildung 4.27: α -FLAG Immunpräzipitation L3MBTL2-enthaltender Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie

A) Die mit 550 mM KCl eluierten Fraktionen (ca. 26 ml) wurden mit je 250 μ l α -FLAG M2 Agarose für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Gebundene Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden mithilfe von je 20 μ g 3xFLAG-Peptiden mehrfach eluiert. Der Überstand (FT) der ersten IP wurde wie zuvor einer weiteren IP unterzogen. Anschließend wurden alle Eluate der beiden IPs vereinigt und mithilfe von 100 μ l StrataClean Beads konzentriert. Input: 0,06%; FT: 0,06%; Eluat: 1% der vereinigten Eluate jeder IP; Beads: 1% des an der Matrix verbliebenen Materials jeder IP; Eluat konz.: 4% der vereinigten, konzentrierten Eluate **B) Gelfiltration der Eluate nach Anionenaustauschchromatographie und α -FLAG IP** 6% (60 μ l) der aus der ersten IP von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,00R gewonnen vereinigten Eluate wurden in einer Superose 6 Säule aufgetrennt. Dargestellt sind die mithilfe von 10 μ l StrataClean Beads konzentrierten Fraktionen zwölf bis neunzehn. Nach Auftrennung in 6%-igen SDS-PAA-Gelen und Western Blotting wurden die Elutionsprofile von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R analysiert. Input: 8% der auf die Säule applizierten Proteinmenge.

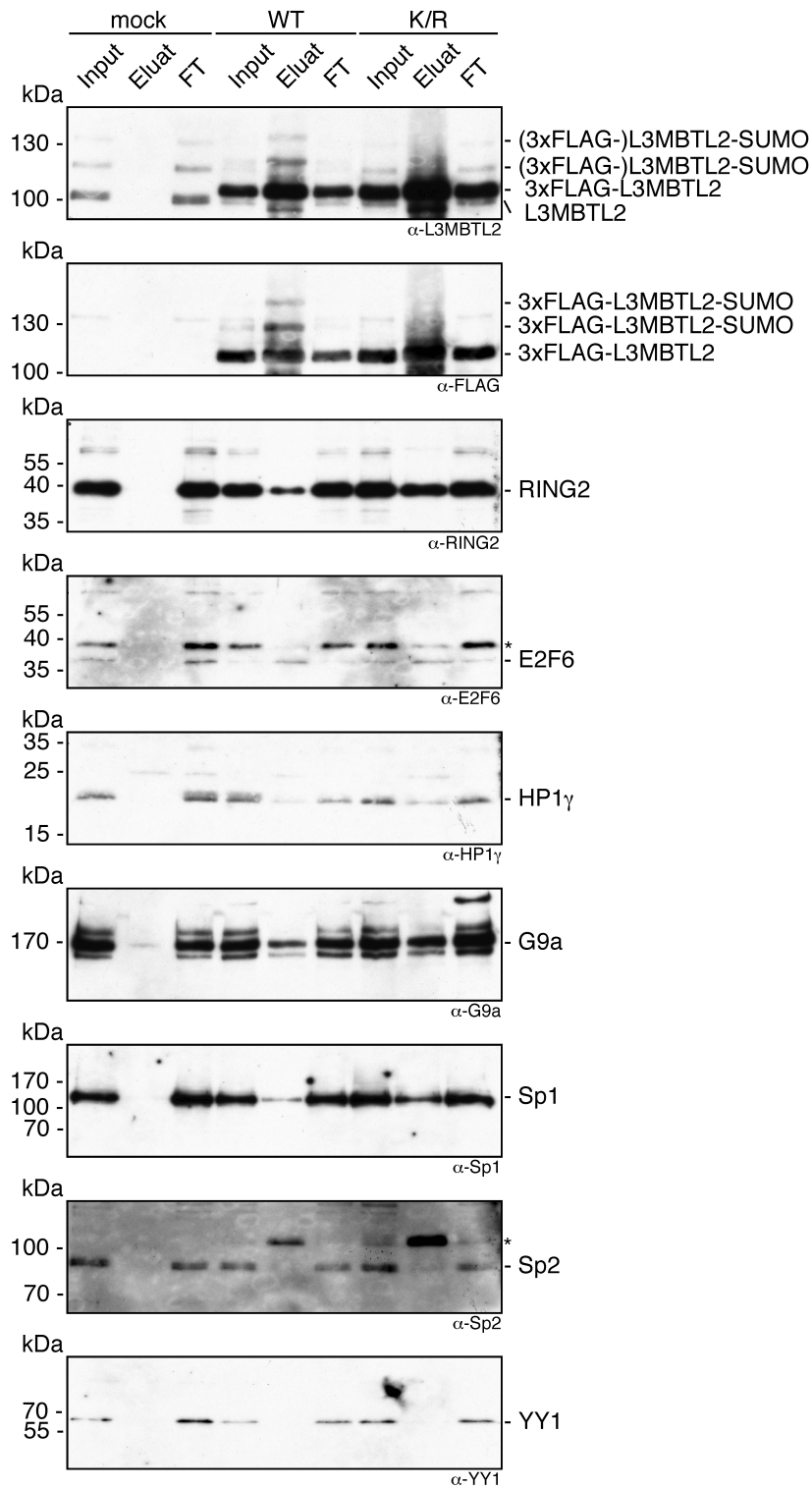


Abbildung 4.28: Analyse der Interaktion von L3MBTL2 mit bekannten Komplexpartnern nach Anionenaustauschchromatographie und α -FLAG Immunpräzipitation

Die Überstände der im Anschluss an eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführten α -FLAG IP (ca. 22 ml) mit Kernextrakten aus HEK-Zellen (mock) sowie Zellen der Linien HEK-3xFLAG-L3MBTL2wt Klon 8 (WT) bzw. HEK-3xFLAG-L3MBTL2K675,700R Klon 21 (K/R) wurden mit je 250 μ l α -FLAG M2 Agarose für drei Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Gebundene

Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden mithilfe von je 20 µg 3xFLAG-Peptiden mehrfach eluiert. 40% der vereinigten Eluate wurden mithilfe von 40 µl StrataClean Beads konzentriert und nach Auftrennung in 6%-igen (α -L3MBTL2, α -FLAG, α G9a, α -Sp2) bzw. 12%-igen (α -RING2, α -E2F6, α -HP1 γ , α -Sp1, α -YY1) SDS-PAA-Gelen und Western Blotting analysiert. Input: 0,09%; FT: 0,09% des nach der IP verbliebenen Überstandes; Eluat: 10% der vereinigten Eluate jeder IP; *: L3MBTL2-Signal aus vorangegangener Detektion.

Zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wurden die nach Anionenaustauschchromatographie und α -FLAG IP mittels 3xFLAG-Peptiden eluierten Proteine in Kollaboration mit Dr. Jeroen Demmers vom Erasmus University Medical Center in Rotterdam einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dafür wurden die 3xFLAG-Eluate direkt, ohne weitere Auftrennung in einem SDS-Gel, mit Trypsin behandelt und die generierten Peptide mithilfe des EASY-nLC Systems in Verbindung mit einem Q Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe der Programme Proteome Discoverer 1.3 und Mascot 2.2 ausgewertet.

Die Analyse ergab insgesamt 554 mit 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R assoziierte Proteine, von denen 62 spezifisch für wildtypisches und 181 spezifisch für SUMOylierungs-defizientes 3xFLAG-L3MBTL2 auftraten (siehe Tabelle A11). Die spezifisch für wildtypisches oder SUMOylierungs-defizientes 3xFLAG-L3MBTL2 aufgetretenen Proteine wurden jedoch nur anhand weniger Peptide identifiziert. Das DNA-Reparatur Protein MSH6, die UDP-Glukose Dehydrogenase UDGH, der translationale Aktivator GCN1 sowie eine Untereinheit der Serin/Threonin Phosphatase PP1 β wurden unter den spezifisch aufgetretenen potentiellen Interaktionspartnern von L3MBTL2 mit den meisten Peptiden nachgewiesen. Tabelle 4.2 zeigt eine Auswahl aller identifizierten Proteine entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu Proteinkomplexen und biologischen Prozessen.

Tabelle 4.2: Massenspektrometrische Analyse L3MBTL2-assoziierter Proteine

Dargestellt sind anhand ihrer Komplex- bzw. Prozesszugehörigkeit und Peptidzahl ausgewählte Proteine. Daneben wurde die Zahl der identifizierten Peptide, der jeweilige SUMOylierungsstatus sowie die zugehörigen Proteinkomplexe bzw. biologischen Prozesse angegeben. Literaturangaben zum SUMOylierungsstatus der einzelnen Proteine finden sich in Tabelle A11 der Daten-CD.

WT: 3xFLAG-L3MBTL2; K/R: 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R; grün: WT-spezifische Proteine; blau: K/R-spezifische Proteine.

Ergebnisse

Protein	# Peptide		SUMOyliert	E2F6.com-1 Komplex	PRC1-like4 Komplex	H2B(De)Ubiquitinierung	NuRD Komplex	FACT Komplex (Orphanides et al., 1998)	PAF Komplex (Zhu et al., 2005a)	Cohesin Komplex (Losada et al., 2000; Sumara et al., 2000)	DNA-Reparatur	Replikation
	WT	K/R										
MGA	36	18	SUMO	x								
L3MBTL2	18	16	SUMO	x	x							
E2F6	6	3		x	x							
DP1	3			x								
G9a	2	1		x								
PCGF6	1			x	x							
GMPS	24	26	polySUMO			x						
USP7	3		polySUMO			x						
H2B	1	1				x						
RNF20	1					x						
RNF40		1				x						
CHD4	18	19	polySUMO				x					
HDAC2	7	7					x					
HDAC1	5	7	SUMO				x					
MTA2	4	3	polySUMO				x					
RBBP4	3	3	SUMO				x					
p66β	2	1	polySUMO				x					
MBD3	1	1					x					
MTA3		2					x					
SUPT16H	11	14	polySUMO					x				
SSRP1	4	8	polySUMO					x				
CTR9	2	3							x			
PAF1	2								x			
LEO1	1	1	polySUMO						x			
CDC73		1							x			
WDR61		1							x			
PDS5A	10	14	polySUMO							x		
SMC1A	6	8								x		
SMC3	6	7	polySUMO							x		
RAD21	2	2	polySUMO							x	x	
NIPBL	1	1								x		
WAPAL	1		polySUMO							x		
STAG2		3								x		
DSCC1		1								x		
PDS5B		1	SUMO							x		
RAD50	11	14	polySUMO								x	
XRCC6	9	6	polySUMO								x	
XRCC5	8	8	polySUMO								x	
MSH2	7	7	polySUMO								x	
MSH6	7		polySUMO								x	

Protein	# Peptide		SUMOyliert	E2F6.com-1 Komplex	PRC1-like4 Komplex	H2B(De)Ubiquitinierung	NuRD Komplex	FACT Komplex (Orphanides et al., 1998)	PAF Komplex (Zhu et al., 2005a)	Cohesin Komplex (Losada et al., 2000; Sumara et al., 2000)	DNA-Reparatur	Replikation
	WT	K/R										
MRE11A	6	5	polySUMO								x	
RUVBL2	2	3									x	
MSH3	2	2									x	
ERCC4	1	1	SUMO								x	
MMS19	1	1	polySUMO								x	
DDB1		4									x	
RUVBL1		2									x	
MLH1		1									x	
MCM7	19	24	polySUMO									x
MCM3	14	15	polySUMO									x
RPA1	9	10	polySUMO									x
RFC2	4	4										x
MCM6	4	2	polySUMO									x
MCM4	3	5	polySUMO									x
RFC5	3	2										x
RFC3	2	3										x
PSMC5	2	2										x
RPA2	1	1										x
PRIM2		3	SUMO									x
RFC1		2	polySUMO									x
MCM2		1	polySUMO									x
RFC4		1										x
RPA3		1										x

Zwei der Proteine mit den meisten zuordenbaren Peptiden waren der Transkriptionsfaktor MGA (Hurlin et al., 1999) sowie L3MBTL2 selbst. Auch E2F6, DP1, G9a und PCGF6 wurden als weitere Komponenten des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002) bzw. PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) Komplexes nachgewiesen.

Ein ebenfalls durch seine hohe Peptidzahl auffallendes und bislang nicht mit L3MBTL2 assoziiertes Protein war die GMP-Synthase GMPS (Huang et al., 2001). In Übereinstimmung mit deren Funktion bei der Deubiquitinierung von H2B (Van der Knaap et al., 2005; van der Knaap et al., 2010; Sarkari et al., 2009) wurden auch die Ubiquitin-spezifische Protease USP7, Histon H2B sowie die beiden E3-Ubiquitin Ligasen RNF20 und RNF40 als L3MBTL2-assoziierte Proteine identifiziert.

Das Chromatin-remodellierende Enzym CHD4 wurde ebenfalls anhand zahlreicher Peptide nachgewiesen. CHD4 stellt wie die ebenso identifizierten Proteine HDAC2, HDAC1, MTA2, RBBP4, p66 β , MBD3 und MTA3, eine Komponente des NuRD Komplexes dar (Tong et al., 1998).

Neben einzelnen Vertretern verschiedener Proteinkomplexe wurden mit SUPT16H und SSRP1 sowie CTR9, PAF1, LEO1, CDC73 und WDR61 alle Komponenten des FACT und PAF Komplexes identifiziert. Beide Komplexe spielen eine entscheidende Rolle für die Elongation der Transkription (Orphanides et al., 1998, 1999; Rozenblatt-Rosen et al., 2005; Zhu et al., 2005a).

Weitere deutlich überrepräsentierte Gruppen L3MBTL2-assoziiierter Proteine waren Mitglieder des Cohesin Komplexes sowie Proteine mit Aufgaben bei der Reparatur von DNA-Schäden und der Replikation (siehe Tabelle 4.2).

Die der Massenspektrometrie zu Grunde liegenden Experimente wurden unter Bedingungen durchgeführt, die eine DeSUMOylierung modifizierter Proteine verhinderten. Aus diesem Grund wurde anhand publizierter Daten untersucht (David et al., 2002; Golebiowski et al., 2009; Matic et al., 2010; Westman et al., 2010; Bruderer et al., 2011; Galisson et al., 2011), welche der mit L3MBTL2 assoziierten Proteine selbst SUMOyliert werden. Die Analyse ergab, dass 181 (33%) der insgesamt 554 identifizierten Proteine als SUMOyliert beschrieben wurden. Besonders auffällig dabei war, dass 120 (66%) der 181 SUMOylierten Proteine polySUMOyliert werden und zu 43% (52) unter den 100 anhand der meisten Peptide identifizierten Proteinen zu finden waren.

5. Diskussion

5.1 Identifizierung Sp3-abhängiger Korepressoren als Substrate der SUMOylierung

5.1.1 Sp3 wird *in vivo* mit SUMO2/3 modifiziert

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass endogenes Sp3 *in vivo* mit SUMO2/3 modifiziert wird. Ob die Modifikation spezifisch mit SUMO2 oder SUMO3 erfolgt, wurde aufgrund der kombinierten Depletion beider Isoformen nicht geklärt.

Die spezifische Modifikation von Sp3 mit SUMO2/3 korreliert mit funktionellen Daten aus Reportergen-Experimenten, in denen die Depletion von SUMO2, nicht aber die von SUMO1 oder SUMO3, zu einer Sp3-abhängigen Aktivierung eines Reportergens führte (Diplomarbeit M. Vollmer). Dieser SUMO2-spezifische Effekt ist daher ein Hinweis darauf, dass Sp3 *in vivo* mit SUMO2 konjugiert vorliegt. Sp3 zählt somit zu einer kleinen Gruppe von SUMOylierten Proteinen, für welche die *in vivo* konjugierte Isoform identifiziert wurde. Weitere Beispiele sind das präferentiell mit SUMO1 modifizierte Protein RanGAP1 (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997) und das präferentiell mit SUMO2 modifizierte nukleäre Antigen Sp100 (Vertegaal et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Koexpression von Sp3 und SUMO1 bzw. SUMO2 in HEK-Zellen wie bereits in Ishikawa-Zellen (Sapetschnig et al., 2002) keine Spezifität für die Konjugation einer SUMO Isoform. Als mögliche Ursache der fehlenden Spezifität kann die Zunahme von frei in der Zelle verfügbarem SUMO1 infolge der Überexpression angenommen werden.

5.1.2 Sp3-abhängige Korepressoren werden selbst mit SUMO modifiziert

Die Sp3-abhängigen Korepressoren L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β und ESET wurden in der vorliegenden Arbeit selbst als Substrate einer SUMOylierung identifiziert. L3MBTL1 wurde in gleicher Weise mit SUMO1 und SUMO2

modifiziert. L3MBTL2 zeigte hingegen, neben einer starken SUMOylierung, eine deutliche Präferenz für die Konjugation von SUMO2. Mi-2 α wies wie auch etwas weniger ausgeprägt Mi-2 β und ESET eine präferentielle Modifikation mit SUMO1 auf. Mi-2 β wurde auch im Rahmen eines *in vitro* Expressions-Screens zerebraler Proteine als Substrat der PolySUMOylierung mit SUMO1 identifiziert (Gocke et al., 2005). Für ESET zeigten Immunpräzipitationen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) sowie die Koexpression von SUMO1 in HEK293T-Zellen eine mehrfache Modifikation mit SUMO1 (Yeap et al., 2009). Die SUMOylierung von ESET vermittelt dabei eine nicht-kovalente Interaktion mit einem SUMO-Interaktionsmotiv (SIM) des Transkriptionsfaktors Oct4. Oct4 ist im Komplex mit SUMOyliertem ESET am Erhalt der Pluripotenz von ES-Zellen beteiligt (Yeap et al., 2009).

Neben Sp3, L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β und SETDB1/ESET wurden sowohl SUMO1 als auch SUMO2/3 am Promotor eines Reportergens nachgewiesen (Stielow et al., 2008b). Sp3 und L3MBTL2 werden *in vivo* spezifisch mit SUMO2 modifiziert. Daher kann vermutet werden, dass der Sp3-abhängige Nachweis von SUMO1 auf die Rekrutierung von Mi-2 α , Mi-2 β und ESET zurückzuführen ist.

Da L3MBTL1, L3MBTL2, Mi-2 α , Mi-2 β wie auch ESET selbst SUMOyliert werden, spielt möglicherweise auch die SUMOylierung dieser Korepressoren eine Rolle bei der Sp3-vermittelten transkriptionellen Repression. SUMO vermittelt unter anderem nicht-kovalente Proteininteraktionen über spezifische SUMO-Interaktionsmotive (SIMs) (Minty et al., 2000). Für Mi-2 α und SETDB1 wurden bereits funktionelle SIMs beschrieben, die eine spezifische Interaktion mit dem SUMOylierten Korepressor KAP1 vermitteln (Ivanov et al., 2007). SUMOyliertes KAP1 rekrutiert dabei SETDB1 an Chromatin und verstärkt dessen Methyltransferase-Aktivität (Ivanov et al., 2007).

Eine Veränderung der katalytischen oder transkriptionellen Aktivität eines Proteins kann ebenfalls infolge einer SUMOylierung auftreten. Daher besteht die Möglichkeit, dass sich die SUMOylierung von L3MBTL1 und L3MBTL2 auf deren repressorische Aktivität auswirkt (Boccuni et al., 2003; Yoo et al., 2010). Gleichermäßen könnte auch die katalytische Aktivität von Mi-2 α , Mi-2 β (Tong et al., 1998) und ESET/SETDB1 (Schultz et al., 2002) durch die Konjugation von SUMO beeinflusst werden.

5.2 Analysen zur Funktion der SUMOylierung von L3MBTL2

5.2.1 L3MBTL2 wird an den Lysinresten 675 und 700 mit SUMO2 modifiziert

Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass L3MBTL2 spezifisch mit SUMO2/3 modifiziert wird. Als Akzeptorstellen dieser SUMOylierung wurden die Lysinreste 675 und 700 im äußersten C-Terminus von volle Länge L3MBTL2 identifiziert. *In vitro* SUMOylierungs-Experimente bestätigten die spezifische Modifikation von L3MBTL2 an den Lysinresten 675 und 700. Zudem wurde PIAS1 als E3-Ligase dieser SUMOylierung identifiziert.

Im Gegensatz zur Situation *in vivo* wurde L3MBTL2 *in vitro* auch mit SUMO1 modifiziert. Die Zugabe von PIAS1 führte dabei zur Ausbildung von PolySUMO1-Ketten. Die Konjugation von SUMO1 *in vitro* ist vermutlich wie im Fall der Überexpression von SUMO1 auf die Zunahme der frei im Reaktionsansatz verfügbaren SUMO1 Moleküle zurückzuführen. Die Ausbildung von PolySUMO1-Ketten wurde im Rahmen einer *in vitro* SUMOylierung auch für die humane DNA Topoisomerase I beobachtet (Yang et al., 2006a).

5.2.2 Die SUMOylierung von L3MBTL2 hat keinen Einfluss auf die Bindung an N-terminale Histonden

Die isolierten MBT-Domänen von L3MBTL2 zeigten in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Präferenz für die Bindung eines H4K20me2-Peptids. Auch mithilfe einer isothermen Titrationskalorimetrie wurde die präferentielle Bindung mono- und dimethylierter Lysinreste durch die isolierten MBT-Domänen von L3MBTL2 beschrieben (Guo et al., 2009). Im Gegensatz dazu beobachteten Trojer *et al.* (2011) eine Methylierungs-unabhängige Bindung an Histone, die zudem völlig unabhängig von den N-Termini der Histone H3 und H4 erfolgte (Trojer et al., 2011).

Volle Länge L3MBTL2 zeigte in der vorliegenden Arbeit eine Bindung an die unmodifizierten N-Termini der Histone H3 und H4. Die SUMOylierung von L3MBTL2 nahm keinen Einfluss auf diese Bindung. Die Bindung von unmodifiziertem wie auch von SUMOyliertem L3MBTL2 nahm jedoch infolge der Mono-, Di- und Trimethylierung des H3K9-Peptids graduell ab.

Publizierte Daten zur Bindung von volle Länge L3MBTL2 an Histone lieferten unterschiedliche Ergebnisse. So zeigten Trojer *et al.* (2011) entsprechend den Daten der vorliegenden Arbeit eine Bindung von volle Länge L3MBTL2 an die unmodifizierten N-Termini der Histone H3 und H4. In diesem Fall nahm die Bindung von L3MBTL2 jedoch infolge der Mono-, Di- und Trimethylierung des H4K20-Peptids graduell ab. Auch Interaktionsstudien mit Histonoktameren zeigten, dass volle Länge L3MBTL2 unabhängig von posttranslationalen Histonmodifikationen an Histone bindet (Trojer et al., 2011). Im Gegensatz dazu beobachteten Yoo *et al.* (2010) eine Methylierungs-abhängige Bindung von volle Länge L3MBTL2 an den N-Terminus von Histon H4 (Yoo et al., 2010). Die Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse zur Bindung von volle Länge L3MBTL2 an N-terminale Histonenden können an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte L3MBTL2 eine Bindung an die unmodifizierten N-Termini von Histonen. Eine mögliche Konsequenz dieser Bindung ist die Kompaktierung von Nukleosomen. Entsprechend ergaben Kompaktierungsstudien mit Oligonukleosomen eine von posttranslationalen Histonmodifikationen unabhängige Kompaktierung durch volle Länge L3MBTL2 (Trojer et al., 2011). L3MBTL2 stellt auch eine stabile Untereinheit des PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) und PRC1.6 (Gao et al., 2012) Komplexes dar. In *Drosophila* führte der rekonstituierte PRC1 Komplex ebenfalls zu einer, von den N-Termini der Histone unabhängigen, Kompaktierung von Oligonukleosomen (Francis et al., 2004).

In Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Methylierungs-unabhängigen Bindung von L3MBTL2 an N-terminale Histonenden ergab auch ein Vergleich der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 mit monomethyliertem H3K9 und H4K20 nahezu keine Überlappungen (Trojer et al., 2011). Auch die repressorische Aktivität von L3MBTL2 wurde nicht durch dessen Fähigkeit zur Bindung einer Methylgruppe beeinflusst (Trojer et al., 2011).

Zusammenfassend kann daher vermutet werden, dass die Bindung von L3MBTL2 an Histone *in vivo* nicht der Rekrutierung des Proteins an Chromatin dient. Vielmehr könnte L3MBTL2 durch die Bindung verschiedener Nukleosomen eine lokale Kompaktierung des Chromatins verursachen und dadurch zur transkriptionellen Repression von Zielgenen beitragen.

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Bindungsverhalten von L3MBTL2 beschränkten sich auf die Analyse der Bindung

methylierter N-terminaler Histonenenden. Gleichmaßen könnten die MBT-Domänen von L3MBTL2 aber auch eine Bindung an methylierte Nicht-Histonproteine vermitteln. Die SUMOylierung von L3MBTL2 könnte eine solche Bindung über nicht-kovalente Wechselwirkungen zudem positiv beeinflussen. Für die isolierten MBT-Domänen von L3MBTL1 wurde bereits die Bindung an den methylierten Lysinrest 382 innerhalb des C-Terminus von p53 beschrieben (West et al., 2010). Daneben vermittelt die der MBT-Domäne sehr ähnliche Chromodomäne von HP1 γ die spezifische Bindung von methyliertem G9a (Sampath et al., 2007).

5.2.3 Identifizierung und Analyse der genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2

In der vorliegenden Arbeit wurden die genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R in HEK-Zellen identifiziert. Ein Vergleich der drei ChIP-Sequenzierungen ergab keine Unterschiede zwischen den Bindungsstellen von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2. Die Bindungsstellen von L3MBTL2 wurden vor allem unmittelbar oberhalb von Transkriptionsstartpunkten nachgewiesen. Auch in MCF7-Zellen (Trojer et al., 2011) und murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (Qin et al., 2012) wurde eine präferenzielle Bindung von L3MBTL2 im Bereich von Transkriptionsstartpunkten beobachtet.

98% der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Zielpromotoren von L3MBTL2 wiesen eine Trimethylierung von H3K4 auf. Auch mehr als 60% der L3MBTL2 Zielpromotoren in murinen ES-Zellen zeigten eine Trimethylierung von H3K4 in der Nähe des Transkriptionsstarts (Qin et al., 2012). Im Gegensatz dazu wiesen die genomweiten Bindungsstellen von L3MBTL2 in K562-Zellen nahezu keine Überlappung mit H3K4me3 auf (Trojer et al., 2011). Die Trimethylierung von H3K4 im Bereich von Transkriptionsstartpunkten kennzeichnet die mit der Ausbildung des Präinitiationskomplexes verbundene Initiation der Transkription. Die Ausbildung des Präinitiationskomplexes kann jedoch sowohl an aktiv transkribierten Genen als auch an Genen erfolgen, deren Transkription „zurückgehalten“ (poised RNA Polymerase II) wird (Guenther et al., 2007). In humanen ES-Zellen weisen die meisten Proteinkodierenden Gene eine Trimethylierung von H3K4 im Bereich des Promotors auf (Guenther et al., 2007). Somit gibt die Trimethylierung von H3K4 an L3MBTL2

Zielpromotoren einen Hinweis darauf, dass L3MBTL2 nicht an inaktive Gene rekrutiert wird. Aufgrund der Funktion von L3MBTL2 als transkriptioneller Repressor (Yoo et al., 2010; Trojer et al., 2011) kann man somit davon ausgehen, dass die Rekrutierung von L3MBTL2 vor allem an Gene erfolgt, deren Transkription „zurückgehalten“ wird. L3MBTL2 könnte dabei am „Zurückhalten“ der RNA Polymerase II beteiligt sein oder zur lokalen Kompaktierung der unmittelbar stromabwärts des Transkriptionsstarts gelegenen Nukleosomen beitragen.

L3MBTL2 wurde gemeinsam mit E2F6 und RING2 als stabiler Bestandteil des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002), PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) und PRC1.6 (Gao et al., 2012) Komplexes beschrieben. In Übereinstimmung mit der stabilen Assoziation von L3MBTL2, E2F6 und RING2 wiesen alle in der vorliegenden Arbeit analysierten L3MBTL2 Zielpromotoren eine Bindung von E2F6 und RING2 auf. Die stark durch L3MBTL2 gebundenen Promotoren zeigten dabei auch eine verstärkte Rekrutierung von E2F6 und RING2. An keinem der Promotoren wurde jedoch ein signifikanter Unterschied in der Rekrutierung von E2F6 und RING2 zwischen untransfizierten und 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R exprimierenden HEK-Zellen festgestellt. Somit nimmt die SUMOylierung von L3MBTL2 keinen Einfluss auf die Rekrutierung von E2F6 und RING2 an L3MBTL2 Zielpromotoren.

In murinen ES-Zellen wurden E2F6 und RING2 ebenfalls an L3MBTL2 Zielpromotoren rekrutiert (Qin et al., 2012). Auf genomweiter Ebene wies dabei ein Drittel aller L3MBTL2-Bindungsstellen eine Überlappung mit RING2-Bindungsstellen auf (Qin et al., 2012). In K562-Zellen zeigten die Bindungsstellen von L3MBTL2 und E2F6 eine Überlappung von nahezu 60% (Trojer et al., 2011).

In Säugerzellen wurden bislang sechs verschiedene PRC1-Subkomplexe (PRC1.1-1.6) beschrieben. L3MBTL2 und E2F6 stellen spezifische Untereinheiten des PRC1.6 Komplexes dar (Gao et al., 2012). Daher kann vermutet werden, dass die Bindung von L3MBTL2 und E2F6 die spezifische Rekrutierung des PRC1.6 Komplexes widerspiegelt. Entsprechend dieser Hypothese wurde in murinen ES-Zellen neben E2F6 auch die PRC1.6-spezifische Untereinheit HDAC1 an L3MBTL2 Zielpromotoren rekrutiert (Qin et al., 2012). Zudem zeigte ein Vergleich der genomweiten Bindungsstellen spezifischer Untereinheiten der verschiedenen PRC1-Subkomplexe in den meisten Fällen die spezifische Rekrutierung an unterschiedliche Zielgene (Gao et al., 2012).

Allen PRC1-Subkomplexen gemein ist die durch RING1 bzw. RING2 katalysierte Monoubiquitinierung von H2AK119. Analysen zum Einfluss von L3MBTL2 auf die Ubiquitinierung von H2A lieferten unterschiedliche Ergebnisse. So führte die stabile Depletion von L3MBTL2 in HEK-Zellen zu einem nahezu vollständigen Verlust der H2A Ubiquitinierung an ausgewählten L3MBTL2 Zielpromotoren (Trojer et al., 2011). Die Depletion von L3MBTL2 in murinen ES-Zellen hatte dagegen keinerlei Auswirkungen auf die Monoubiquitinierung von H2A an durch L3MBTL2 gebundenen Promotoren (Qin et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde die Monoubiquitinierung von H2A an jedem der zwölf analysierten L3MBTL2 Zielpromotoren nachgewiesen. Dabei wiesen sowohl stark, als auch schwach durch L3MBTL2 gebundene Promotoren eine Ubiquitinierung von H2A auf. Die Überexpression von wildtypischem oder SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 zeigte keine Auswirkungen auf die Ubiquitinierung. Somit nimmt die SUMOylierung von L3MBTL2 keinen Einfluss auf die Monoubiquitinierung von H2AK119 an L3MBTL2 Zielpromotoren.

Erstaunlicherweise wurde auch keine Korrelation zwischen der Bindung von RING2 und der Stärke der H2A Ubiquitinierung festgestellt. So wiesen Promotoren mit einer starken RING2 Bindung weniger monoubiquitiniertes H2A auf als schwach durch RING2 gebundene Promotoren. Allerdings wies auch ein nicht durch L3MBTL2 gebundener Bereich monoubiquitiniertes H2A auf.

5.2.4 Welche Faktoren vermitteln die Rekrutierung von L3MBTL2 an Chromatin?

Eine spezifische Rekrutierung der verschiedenen PRC1-Subkomplexe geht mit der Notwendigkeit individueller, von den Untereinheiten des Kernkomplexes unabhängiger, Rekrutierungsmechanismen einher. In der vorliegenden Arbeit wurde die E-Box als das am stärksten überrepräsentierte Motiv innerhalb der Bindungssequenzen von L3MBTL2 identifiziert. Auch in murinen ES-Zellen stellte die E-Box das am häufigsten aufgetretene Bindungsmotiv innerhalb der Bindungssequenzen von L3MBTL2 dar (Qin et al., 2012). Das Bindungsmotiv von E2F Transkriptionsfaktoren wurde in beiden Fällen trotz der stabilen Assoziation von L3MBTL2 und E2F6 nicht identifiziert.

In Übereinstimmung mit einer von E2F6 unabhängigen Rekrutierung L3MBTL2-enthaltender Komplexe wurde in murinen ES-Zellen auch E2F6 selbst unabhängig von einem E2F-Bindungsmotiv, jedoch abhängig von L3MBTL2, an ausgewählte Zielpromotoren rekrutiert (Qin et al., 2012). Im Gegensatz dazu beobachteten Trojer *et al.* (2011) eine zum größten Teil von L3MBTL2 unabhängige Rekrutierung von E2F6 an L3MBTL2 Zielpromotoren (Trojer et al., 2011).

L3MBTL2 ist im Rahmen des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002) und PRC1.6 Komplexes (Gao et al., 2012) neben E2F6 stabil mit dem heterodimeren, E-Box-bindenden Transkriptionsfaktor MGA/MAX (Hurlin et al., 1999) assoziiert. Daher kann vermutet werden, dass die Rekrutierung des PRC1.6 Komplexes an L3MBTL2 Zielpromotoren nicht mithilfe von E2F6, sondern über die MGA/MAX-vermittelte Bindung von E-Boxen erfolgt.

5.2.5 Untersuchung des Effekts der SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität von L3MBTL2

L3MBTL2 wurde als transkriptioneller Repressor beschrieben (Yoo et al., 2010; Trojer et al., 2011), dessen repressorische Aktivität in Abhängigkeit von Histondeacetylasen verstärkt wird (Yoo et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Reporter-gen-Experimente bestätigten L3MBTL2 als transkriptionellen Repressor. Das Reporter-gen wurde dabei gleichermaßen durch wildtypisches und SUMOylierungs-defizientes L3MBTL2 reprimiert. Daher spielt die SUMOylierung von L3MBTL2 im Rahmen von Reporter-gen-Experimenten keine Rolle für die repressorische Funktion von L3MBTL2.

Mithilfe von Microarray-Analysen wurden 846 nach Überexpression von wildtypischem bzw. SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 deregulierte Gene identifiziert. Ein Vergleich mit den 8009 für endogenes L3MBTL2 identifizierten Bindungsstellen ergab, dass etwa 2% der gebundenen Zielgene dereguliert waren. Als mögliche Ursache dieses geringen Anteils deregulierter Zielgene kann die weiterhin vorhandene Expression von endogenem L3MBTL2 angenommen werden. So wurden Zielpromotoren sowohl von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R als auch durch das SUMOylierte endogene Protein gebunden. Der Effekt der Überexpression von wildtypischem bzw. SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 wurde daher möglicherweise durch endogenes L3MBTL2 überlagert.

Die auch durch Trojer *et al.* (2011) beschriebenen, stark durch L3MBTL2 gebundenen Zielgene *CDC7*, *RPA2* und *UXT* stellen Beispiele für eine mögliche Überlagerung des Effekts der Überexpression von L3MBTL2 dar. So zeigte weder die Überexpression von wildtypischem L3MBTL2 noch die der SUMOylierungs-defizienten Mutante Auswirkungen auf die Expression von *CDC7*, *RPA2* oder *UXT*. Die Depletion von endogenem L3MBTL2 hatte hingegen eine verstärkte Expression von *CDC7*, *RPA2* und *UXT* zur Folge (persönliche Kommunikation Dr. Bastian Stielow).

Analysen zur Expression des sehr stark durch L3MBTL2 gebundenen Zielgens *E2F6* lieferten unterschiedliche Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *E2F6* nicht durch die Überexpression von wildtypischem oder SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 beeinflusst. Die Depletion von endogenem L3MBTL2 führte dagegen zu einer verstärkten Expression (persönliche Kommunikation Dr. Bastian Stielow). Expressionsstudien in murinen L3MBTL2^{-/-} ES-Zellen ergaben ebenfalls eine gegenüber wildtypischen Zellen verstärkte Expression von *E2F6* (Qin *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu zeigte die Depletion von L3MBTL2 in von Trojer *et al.* (2011) durchgeführten Expressionsstudien keine Auswirkungen auf das Expressionsniveau von *E2F6*. Ob die nach Depletion von endogenem L3MBTL2 beobachtete Deregulation von *CDC7*, *RPA2*, *UXT* und *E2F6* in Abhängigkeit der SUMOylierung von L3MBTL2 erfolgte, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* als spezifisch durch SUMOyliertes L3MBTL2 reprimierte Zielgene identifiziert. Besonders auffällig dabei war, dass *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* im Gegensatz zu *CDC7*, *RPA2*, *UXT* und *E2F6* eine schwache Rekrutierung von L3MBTL2 aufwiesen. Die schwache Rekrutierung von L3MBTL2 könnte zu einer geringen Zahl von endogenen L3MBTL2 Molekülen an den entsprechenden Promotoren widerspiegeln. Als Konsequenz könnte eine infolge der Überexpression von L3MBTL2 gesteigerte Rekrutierung die Expression der Gene beeinflussen. Zum anderen könnte die schwache Rekrutierung von L3MBTL2 auf eine geringere Anzahl von Zellen zurückgeführt werden, die eine Rekrutierung von L3MBTL2 an die entsprechenden Promotoren aufweisen. In diesem Fall könnte die Überexpression von L3MBTL2 die Rekrutierung in einer größeren Zahl von Zellen zur Folge haben. Entgegen beider Hypothesen zeigte ein Vergleich der Rekrutierung von endogenem L3MBTL2 mit der

von 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R an die Promotoren von *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* keine signifikanten Unterschiede.

Der Mechanismus der SUMO-abhängigen Repression schwach durch L3MBTL2 gebundener Gene ist noch unklar. Sowohl E2F6 und RING2 als auch monoubiquitiniertes H2A wurden an jedem der analysierten L3MBTL2 Zielpromotoren unabhängig von der L3MBTL2 SUMOylierung nachgewiesen. Bislang kann daher nur ein Einfluss von E2F6 und RING2 sowie der Monoubiquitinierung von H2A auf die Repression von *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* durch SUMOyliertes L3MBTL2 ausgeschlossen werden.

5.3 Die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung führt zur Stabilisierung hochmolekularer Proteinkomplexe

L3MBTL2 wurde als Bestandteil des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002), PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) und PRC1.6 (Gao et al., 2012) Komplexes beschrieben. Alle drei Komplexreinigungen erfolgten unter Bedingungen, die den Verlust einer möglichen SUMOylierung einzelner Komplexkomponenten erlaubten. Somit ist L3MBTL2 unabhängig von SUMO mit den beschriebenen Komplexen assoziiert. Die SUMO-unabhängige Assoziation von L3MBTL2 mit hochmolekularen Proteinkomplexen wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung durch NEM führte jedoch zu einer dramatischen Verschiebung des Elutionsprofils von L3MBTL2 hin zu Fraktionen des maximal mittels Gelfiltration trennbaren Molekulargewichts. Ein Vergleich der Elutionsprofile von wildtypischem und SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 wies dabei keine Unterschiede auf. Demnach erfolgte die Verschiebung des Elutionsprofils von L3MBTL2 unabhängig von dessen eigener SUMOylierung.

Aufgrund des gravierenden Effekts der proteomweiten SUMOylierung auf das Molekulargewicht L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe kann spekuliert werden, dass sich die Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen in Abhängigkeit SUMOylierter Komplexkomponenten verändert. Dabei scheint der Verlust der SUMOylierung eines einzelnen Proteins jedoch nicht ausreichend, um die Komplexorganisation zu beeinflussen. Der Verlust der SUMOylierung mehrerer Komplexkomponenten könnte hingegen die Stabilität des Komplexes beeinträchtigen

und zur Ausbildung intermediärer Subkomplexe führen. Die Hypothese einer SUMO-abhängigen Stabilisierung von Multiproteinkomplexen wird durch die Ergebnisse verschiedener Komplexreinigungen gestützt. So identifizierten Ogawa *et al.* (2002) im Zuge der Aufreinigung des E2F6.com-1 Komplexes einen weiteren Komplex. Die Analyse beider Komplexe nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wies deutliche Übereinstimmungen auf, wobei im E2F6.com-1 Komplex zusätzliche Proteine identifiziert wurden (Ogawa *et al.*, 2002). Die Reinigung des PRC1-like4 Komplexes zeigte die stabile Assoziation von L3MBTL2 mit PCGF6, RING1, RING2, E2F6 und HP1 γ (Trojer *et al.*, 2011). Alle sechs Komplexkomponenten stellen gleichzeitig Bestandteile des E2F6.com-1 Komplexes dar. Weiterführende Studien ergaben zudem, dass die ebenfalls im E2F6.com-1 Komplex identifizierten Proteine DP1, MAX, MGA und YAF2 auch stabil mit den PRC1-like4 Untereinheiten L3MBTL2, PCGF6, RING2, E2F6 und HP1 γ assoziiert sind (Gao *et al.*, 2012). Der gesamte Komplex wurde dann als PRC1.6 Komplex bezeichnet (Gao *et al.*, 2012).

Neben den bereits beschriebenen Komplexen lieferten Gelfiltrationen in der vorliegenden Arbeit weitere Hinweise auf einen partiellen Zerfall hochmolekularer Proteinkomplexe infolge des Verlusts der allgemeinen SUMOylierung. So zeigten die Elutionsprofile von L3MBTL2 nach Verlust der SUMOylierung Signale in allen Fraktionen. Die Elutionsprofile von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R wiesen dazu ähnlich der Gelfiltration des PRC1-like4 Komplexes (Trojer *et al.*, 2011) hochmolekulare Signale im Bereich des Ausschlussvolumens der Säule auf. Auch das Elutionsmaximum von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R bei etwa 300 kDa stimmt mit der Gelfiltration des PRC1-like4 Komplexes überein. Als erster Hinweis auf eine SUMO-abhängige Stabilisierung hochmolekularer Proteinkomplexe führte zudem der Einsatz einer SUMO-spezifischen Isopeptidase im Anschluss an die Konservierung der SUMOylierung zur partiellen Verschiebung der Signale hin zu niederen Molekulargewichten (persönliche Kommunikation Olga Herdt).

Als weiterer möglicher Effekt einer Konservierung der proteomweiten SUMOylierung ist die Stabilisierung lokaler oder temporärer Proteininteraktionen denkbar. So wurde zum Beispiel neben L3MBTL2 auch Mi-2 infolge der konservierten SUMOylierung in Fraktionen des maximal mittels Gelfiltration trennbaren Molekulargewichts nachgewiesen. Bisher wurde Mi-2 jedoch nur in murinen ES-Zellen als Interaktionspartner von L3MBTL2 beschrieben (Qin *et al.*,

2012) und sollte im Kontext des NuRD Komplexes ein geringeres Molekulargewicht aufweisen (Feng and Zhang, 2001). Folglich kann spekuliert werden, dass das in seiner Gesamtheit im Bereich mehrerer Megadalton auftretende Signal von Mi-2 auf nicht-kovalente Wechselwirkungen mit L3MBTL2-enthaltenden Proteinkomplexen zurückzuführen ist. Zudem wurde Mi-2 in der vorliegenden Arbeit selbst als Substrat der SUMOylierung identifiziert. Daher könnte Mi-2 im Verbund mit anderen SUMOylierten NuRD-Untereinheiten wie HDAC1 und MTA2 (David et al., 2002; Westman et al., 2010; Bruderer et al., 2011) sowohl zur Stabilisierung nicht-kovalenter Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beitragen als auch die Stabilität des NuRD Komplexes beeinflussen.

Neben L3MBTL2 und Mi-2 wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Transkriptionsfaktoren Sp3 und Sp1 partiell in hochmolekularen Fraktionen nachgewiesen. Da bislang weder für Sp3 noch für Sp1 eine stabile Assoziation mit Proteinkomplexen beschrieben wurde, stellen die Elutionsprofile der beiden Transkriptionsfaktoren einen weiteren Hinweis auf eine SUMO-abhängige Stabilisierung lokaler oder temporärer Proteininteraktionen dar. So führt Sp3 an bestimmten Promotoren unter anderem zur SUMO-abhängigen Rekrutierung von L3MBTL2 und Mi-2 (Stielow et al., 2008b). Folglich könnte die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung eine Interaktion zwischen Sp3 und L3MBTL2- bzw. Mi-2-enthaltenden Proteinkomplexen stabilisieren und die partielle Verschiebung von Sp3 hin zu höheren Molekulargewichten verursachen. In Übereinstimmung mit der Hypothese einer temporären, nicht stabilen Interaktion zwischen Sp3 und L3MBTL2 zeigte die Immunpräzipitation von L3MBTL2 in der vorliegenden Arbeit kein Signal für Sp3.

Im Gegensatz dazu wurde Sp1 nach Aufreinigung L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe mittels Immundetektion als stabil mit L3MBTL2 assoziiertes Protein nachgewiesen. Daher sind die für Sp1 erhaltenen partiellen Signale in hochmolekularen Fraktionen, anders als für Sp3, vermutlich auf eine stabile Assoziation von Sp1 mit L3MBTL2-enthaltenden Multiproteinkomplexen zurückzuführen.

5.4 Aufreinigung L3MBTL2-enhaltender Proteinkomplexe zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von SUMOyliertem L3MBTL2

L3MBTL2 wurde gemeinsam mit E2F6, DP1, MGA, MAX, EuHMTase1, G9a, HP1 γ , RING1, RING2, PCGF6, YAF2, RYBP, WDR5, HDAC1 und HDAC2 als Bestandteil des E2F6.com-1 (Ogawa et al., 2002), PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) und PRC1.6 (Gao et al., 2012) Komplexes beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die stabile Interaktion von L3MBTL2 mit RING2, E2F6, HP1 γ und G9a bestätigt. Die SUMOylierung von L3MBTL2 nahm dabei keinen Einfluss auf die Bindung. Da sowohl die Aufreinigung des E2F6.com-1 Komplexes als auch die des PRC1-like4 und PRC1.6 Komplexes unter Bedingungen erfolgte, die einen Verlust der SUMOylierung nicht verhinderten, entsprach die SUMO-unabhängige Interaktion mit L3MBTL2 den Erwartungen.

Mithilfe einer im Anschluss an die Aufreinigung L3MBTL2-enhaltender Proteinkomplexe durchgeführten Massenspektrometrie wurden 554 potentielle Interaktionspartner von L3MBTL2 identifiziert. Der Nachweis von DNA- oder RNA-abhängigen Interaktionen wurde dabei durch eine Benzonase-Behandlung der Extrakte im Vorfeld der Komplexereinigung ausgeschlossen. Ausgewählte Proteine wurden aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu bekannten Proteinkomplexen oder biologischen Prozessen zusammengefasst.

E2F6.com-1, PRC1-like4 und PRC1.6 Komplex:

Die massenspektrometrischen Analyse bestätigte die stabile Assoziation von L3MBTL2 mit MGA, E2F6, DP1, G9a, PCGF6, HDAC1 und HDAC2.

MGA

Der anhand zahlreicher Peptide nachgewiesene Transkriptionsfaktor MGA bindet als Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor MAX an E-Boxen (Hurlin et al., 1999). Innerhalb der Bindungssequenzen von L3MBTL2 wurde die E-Box in der vorliegenden Arbeit als das am stärksten überrepräsentierte Motiv identifiziert. Daher kann vermutet werden, dass MGA/MAX die Rekrutierung L3MBTL2-enhaltender Proteinkomplexe vermitteln.

E2F6

Der transkriptionelle Repressor E2F6 zählt zur Familie der E2F Transkriptionsfaktoren und bindet als Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor DP1 an die Konsensussequenz TTTCCCGC (Cartwright et al., 1998; Trimarchi et al., 1998). Den im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Bindungssequenzen von L3MBTL2 zu Folge scheint E2F6 jedoch nicht an der Rekrutierung L3MBTL2-enthaltender Komplexe beteiligt zu sein.

G9a

Die ebenfalls mit L3MBTL2 assoziierte Histonmethyltransferase G9a katalysiert die Mono- und Dimethylierung von H3K9 (Tachibana et al., 2001). Entsprechend einer stabilen Assoziation mit G9a führte die Deletion von L3MBTL2 in murinen ES-Zellen zu einer Abnahme von mono- und dimethyliertem H3K9 (Qin et al., 2012).

PCGF6

Das auch als MBLR bekannte RING-Finger Protein PCGF6 stellt eines von insgesamt sechs Säuger-Orthologen des *Drosophila* Polycomb Proteins dPsc dar (Akasaka et al., 2002). PCGF6 bildet die charakteristische Untereinheit des PRC1.6 Komplexes (Gao et al., 2012).

HDACs

Die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 wurden als weitere Komponenten des PRC1.6 Komplexes im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse nachgewiesen. In Übereinstimmung mit der Interaktion zwischen L3MBTL2 und HDACs wiesen murine L3MBTL2^{-/-} ES-Zellen eine verstärkte Acetylierung der Histone H3 und H4 auf (Qin et al., 2012).

Für die ebenfalls stabil mit L3MBTL2 assoziierten Proteine MAX, EuHMTase1, HP1 γ , RING1, RING2, YAF2, RYBP und WDR5 wurden in der vorliegenden Arbeit durch Massenspektrometrie keine Peptide identifiziert. Eine exemplarische Untersuchung der aufgereinigten Proteinkomplexe mittels Immundetektion bestätigte jedoch die Interaktion von L3MBTL2 mit RING2 und HP1 γ . Die Diskrepanz zwischen Massenspektrometrie und Immundetektion kann im Fall von RING2 und HP1 γ vermutlich auf die Aminosäuresequenz der beiden Proteine zurückgeführt

werden. So weisen sowohl RING2 als auch HP1 γ zahlreiche Lysin- und Argininreste auf, die nach Trypsinverdau zur Generierung sehr kleiner Peptide führen. Dementgegen wurden RING2, HP1 γ und RYBP jedoch erfolgreich in murinen ES-Zellen durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Qin et al., 2012).

GMPS, USP7 und H2B:

Das überraschendste Ergebnis der Massenspektrometrie stellte die anhand zahlreicher Peptide identifizierte Assoziation der Guanosin-5'-monophosphat Synthetase (GMPS) mit L3MBTL2 dar. Bei GMPS handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein, das die Aminierung von Xantosin-5'-monophosphat zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) katalysiert und somit eine Schlüsselrolle bei der *de novo* Synthese von Guanin spielt (Huang et al., 2001). Neben seiner metabolischen Funktion ist GMPS im Zellkern stabil mit der Ubiquitin-spezifischen Protease USP7 assoziiert (Van der Knaap et al., 2005; van der Knaap et al., 2010; Sarkari et al., 2009).

USP7 katalysiert die Deubiquitinierung von Histon H2B in Abhängigkeit von GMPS (Van der Knaap et al., 2005; Sarkari et al., 2009; Faesen et al., 2011) und wurde in der vorliegenden Arbeit wie auch H2B als mit L3MBTL2 assoziiertes Protein identifiziert. Der Nachweis von H2B beruht dabei vermutlich auf einer indirekten Interaktion, da L3MBTL2 im Rahmen von GST-Pulldown Experimenten keine Bindung an H2B zeigte (Trojer et al., 2011).

Neben H2B stellen auch p53 und die Ubiquitin-Ligase MDM2 Substrate der Deubiquitinierung durch USP7 dar (Li et al., 2002, 2004; van der Knaap et al., 2005). Wie bei H2B wurde die katalytische Aktivität von USP7 gegenüber p53 in *Drosophila* durch die Interaktion mit GMPS verstärkt (Van der Knaap et al., 2005). GMPS stellt somit ein bifunktionales Protein dar, welches zum einen die Synthese von GMP im Zytoplasma katalysiert und zum anderen die Deubiquitinierung von H2B und p53 durch USP7 im Zellkern verstärkt.

Die Monoubiquitinierung von Histon H2B im Bereich von Promotoren führt zur Stabilisierung der Nukleosomen und verhindert dadurch die Initiation der Transkription inaktiver Gene (Chandrasekharan et al., 2009). Eine Deubiquitinierung durch USP7/GMPS würde somit zur Destabilisierung entsprechender Nukleosomen und in der Folge zur Initiation der Transkription führen. L3MBTL2 wurde in Übereinstimmung mit einer durch USP7/GMPS vermittelten Initiation der

Transkription fast ausschließlich an Promotoren aktiver Gene nachgewiesen (siehe auch 5.2.2).

In *Drosophila* wurden GMPS und USP7 gemeinsam mit der PRC1 Untereinheit dPc an den *Ubx*-Promotor rekrutiert (Van der Knaap et al., 2005). Dies korreliert mit der stabilen Integration von L3MBTL2 im PRC1-like4 (Trojer et al., 2011) und PRC1.6 (Gao et al., 2012) Komplex.

FACT und PAF Komplex:

Ein weiteres interessantes Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse stellte die Identifizierung von SUPT16H und SSRP1 als L3MBTL2-assoziierte Proteine dar. SUPT16H und SSRP1 bilden gemeinsam den heterodimeren FACT (Facilitates Chromatin Transcription) Komplex, der eine entscheidende Rolle für die Elongation der Transkription spielt (Orphanides et al., 1998, 1999). Die Rekrutierung des FACT Komplexes erfolgt an Nukleosomen unmittelbar stromabwärts des Transkriptionsstarts (Saunders et al., 2003; Kouskouti and Talianidis, 2005). In seiner Funktion als Histonchaperon bindet der Komplex das Nukleosom und führt zur Entfernung eines H2A/H2B Dimers (Formosa et al., 2002; Belotserkovskaya et al., 2003). Der aus dem Verlust des H2A/H2B Dimers resultierende Zerfall des gesamten Nukleosoms ermöglicht das Fortschreiten der RNA Polymerase II und damit die Elongation der Transkription. Der FACT Komplex begleitet die RNA Polymerase entlang des gesamten kodierenden Bereichs und rekonstituiert die zuvor entfernten Nukleosomen unmittelbar im Anschluss an die Passage der RNA Polymerase (Belotserkovskaya et al., 2003; Mason and Struhl, 2003).

Die Entfernung des H2A/H2B Dimers durch den FACT Komplex alleine ist jedoch sehr ineffizient und ermöglicht nur geringe Elongationsraten. Um die Frequenz der Entfernung des H2A/H2B Dimers zu erhöhen, erfolgt daher die Monoubiquitinierung von H2B an den durch FACT gebundenen, stromabwärts des Transkriptionsstarts gelegenen Nukleosomen (Pavri et al., 2006). Die Monoubiquitinierung von H2B stromabwärts von Transkriptionsstartpunkten führt dabei im Gegensatz zur Ubiquitinierung im Bereich von Promotoren (Chandrasekharan et al., 2009) zu einer Aktivierung der Transkription. Dazu rekrutiert FACT einen trimere Komplex bestehend aus dem PAF Komplex, dem RNF20/40 Komplex und dem E2 Enzym der Ubiquitinierung UbcH6 (Krogan et al., 2002; Zhu et al., 2005b; Pavri et al., 2006).

Der humane PAF (RNA Polymerase II associated factor) Komplex beinhaltet die Proteine CTR9, PAF1, LEO1, CDC73 und WDR61 und interagiert sowohl mit dem FACT Komplex als auch mit der RNA Polymerase II (Rozenblatt-Rosen et al., 2005; Zhu et al., 2005a). Alle Komponenten des PAF Komplexes wurden wie auch die beiden Ubiquitin E3-Ligasen RNF20 und RNF40 im Rahmen der vorliegenden Arbeit als potentiell mit L3MBTL2 assoziierte Proteine identifiziert.

Die Rekrutierung des FACT Komplexes erfolgt im Anschluss an die Initiation der Transkription an das stromabwärts des Transkriptionsstarts gelegene Nukleosom. L3MBTL2 wurde in der vorliegenden Arbeit unmittelbar stromaufwärts von Transkriptionsstartpunkten nachgewiesen. Zudem wurde für die identifizierten Zielgene entsprechend der Trimethylierung von H3K4 eine aktive Initiation der Transkription postuliert. Somit stellt die Assoziation von L3MBTL2 mit dem FACT Komplex einen weiteren Hinweis dafür dar, dass die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung zu einer Stabilisierung lokaler und temporärer Protein-Interaktionen beiträgt. Desweiteren lässt die geringe Peptidzahl der Untereinheiten des PAF und RNF20/40 Komplexes eine indirekte Interaktion mit L3MBTL2 vermuten, die durch den FACT Komplex vermittelt wird.

Im Zuge der Massenspektrometrie wiesen 62 der insgesamt 554 identifizierten Proteine eine spezifische Interaktion mit wildtypischem L3MBTL2 auf, wogegen 181 Proteine spezifisch mit der SUMOylierungs-defizienten Mutante assoziiert waren. Die spezifisch für wildtypisches oder SUMOylierungs-defizientes 3xFLAG-L3MBTL2 aufgetretenen Proteine wurden jedoch anhand nur weniger Peptide identifiziert. Zu den spezifisch aufgetretenen, durch mindestens fünf Peptide repräsentierten, Proteinen zählten das DNA-Reparatur Protein MSH6, die UDP-Glukose Dehydrogenase UGDH, der translationale Aktivator GCN1 sowie eine Untereinheit der Serin/Threonin Phosphatase PP1 β .

Als mögliche Ursache der fehlenden Spezifität gegenüber wildtypischem oder SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 kann die SUMOylierung zahlreicher mit L3MBTL2 assoziierter Proteine angenommen werden. So wurden 181 der insgesamt 554 potentiellen Interaktionspartner von L3MBTL2 selbst als Substrate der SUMOylierung beschrieben. Demzufolge nimmt der Verlust der SUMOylierung nur einer Komplexkomponente vermutlich keinen Einfluss auf die Zusammensetzung eines gesamten Proteinkomplexes. Jedoch kann angenommen werden, dass sich die

DeSUMOylierung aller modifizierten Komplexkomponenten nachhaltig auf die Organisation des Komplexes auswirkt.

So hatte die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung eine dramatische Zunahme des Molekulargewichts L3MBTL2-enthaltender Komplexe zur Folge. Der Verlust der SUMOylierung von L3MBTL2 alleine zeigte dagegen keinerlei Auswirkungen auf das Elutionsprofil von L3MBTL2. Analog zu der Hypothese eines synergistischen Effekts der SUMOylierung aller modifizierten Komplexkomponenten beschrieben Psakhye und Jentsch (2012) die zeitgleiche SUMOylierung zahlreicher, an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligter, Proteine (Psakhye and Jentsch, 2012). Dabei zeigte nur der Verlust der SUMOylierung mehrerer Reparatur-Proteine Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur. Die Autoren spekulierten daher, dass die SUMOylierung eines einzelnen Proteins innerhalb eines Multiproteinkomplexes oder Reaktionsweges nur eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr beschrieben sie die SUMOylierung als einer Art „Klebstoff“, der lokale Interaktionen zwischen Proteinen stabilisiert (Psakhye and Jentsch, 2012).

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität von L3MBTL2 untersucht. Die Überexpression von L3MBTL2 führte zu einer SUMO-abhängigen Repression von schwach durch L3MBTL2 gebundenen Genen. Um zu untersuchen, ob auch Gene mit einer starken L3MBTL2 Rekrutierung wie *CDC7*, *RPA2*, *UXT* oder *E2F6* in Abhängigkeit von SUMOyliertem L3MBTL2 reprimiert werden, sollte endogenes L3MBTL2 depletiert und durch die Expression von wildtypischem bzw. SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 ersetzt werden. Bekannte L3MBTL2 Zielgene könnten dann gezielt auf einen Effekt der SUMOylierung von L3MBTL2 hin untersucht werden. Dazu könnten mithilfe von Microarray Analysen weitere spezifisch durch SUMOyliertes L3MBTL2 deregulierte Gene identifiziert werden.

Die Konservierung der proteomweiten SUMOylierung führte in Gelfiltrations-Experimenten zu einer drastischen Verschiebung des Elutionsprofils L3MBTL2-enthaltender Komplexe. Die SUMOylierung verschiedener Komplexkomponenten hat dabei vermutlich eine Stabilisierung hochmolekularer Multiproteinkomplexe zur

Folge. Das zur Konservierung der allgemeinen SUMOylierung eingesetzte Reagenz NEM verursacht eine unspezifische Alkylierung von Cysteinresten. Dadurch werden unter anderem SUMO-spezifische Isopeptidasen inaktiviert. Um einen SUMO-unabhängigen NEM-Effekt auf die Zusammensetzung von Proteinkomplexen auszuschließen, sind weitere Kontrollexperimente nötig. Zum einen muss untersucht werden, ob der Einsatz SUMO-spezifischer Isopeptidasen das Elutionsprofil von L3MBTL2 beeinflusst. Zum anderen könnten die Auswirkungen einer Depletion von endogenem SUMO auf das Elutionsprofil von L3MBTL2 analysiert werden.

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse L3MBTL2-enthaltender Proteinkomplexe wurden neue potentielle Interaktionspartner von L3MBTL2 identifiziert. Um mögliche Interaktionen zu validieren, sollten Koimmunpräzipitationen der endogenen oder überexprimierten Proteine mit L3MBTL2 durchgeführt werden. Durch die spezifische Immunpräzipitation von wildtypischem oder SUMOylierungs-defizientem L3MBTL2 könnte zudem der Einfluss der SUMOylierung von L3MBTL2 auf die jeweilige Interaktion untersucht werden. Da viele der potentiellen Interaktionspartner von L3MBTL2 selbst SUMOyliert werden, könnte auch deren SUMOylierung die Interaktion mit L3MBTL2 beeinflussen. Koimmunpräzipitationen sollten daher sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von NEM erfolgen. Um auch hier einen SUMOylierungs-unabhängigen NEM-Effekt auszuschließen, sollten die Extrakte für eine unabhängige Koimmunpräzipitation nach Zugabe von NEM mit SUMO-spezifischen Isopeptidasen behandelt werden.

Einen der anhand zahlreicher Peptide identifizierten potentiellen Interaktionspartner von L3MBTL2 stellt die GMP-Synthetase GMPS dar. Im Fall einer erfolgreichen Validierung dieser Interaktion könnte mithilfe von GST-Pulldown Experimenten untersucht werden, ob GMPS direkt mit L3MBTL2 interagiert. Durch ChIP-Experimente könnte die Rekrutierung von GMPS an L3MBTL2 Zielgene analysiert werden. Die Identifizierung der genomweiten Bindungsstellen von GMPS würde zudem einen Vergleich mit der Gesamtheit der L3MBTL2 Bindungsstellen ermöglichen.

GMPS wird selbst mit SUMO modifiziert. Daher sollte auch der Einfluss der GMPS SUMOylierung auf die Interaktion mit L3MBTL2 und die Rekrutierung von GMPS an Chromatin untersucht werden. Neben der Funktion als GMP-Synthetase verstärkt GMPS die durch USP7 katalysierte Deubiquitinierung von monoubiquitiniertem H2B.

In vitro Deubiquitinierungs-Experimente könnten Aufschluss über eine mögliche Funktion von L3MBTL2 bei der Deubiquitinierung von H2B geben.

6. Literaturverzeichnis

Addou-Klouche, L., Adélaïde, J., Finetti, P., Cervera, N., Ferrari, A., Bekhouche, I., Sircoulomb, F., Sotiriou, C., Viens, P., Moulessehou, S. et al. (2010). Loss, mutation and deregulation of L3MBTL4 in breast cancers. *Molecular Cancer* 9, 213.

Akasaka, T., Takahashi, N., Suzuki, M., Koseki, H., Bodmer, R., and Koga, H. (2002). MBLR, a new RING finger protein resembling mammalian Polycomb gene products, is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. *Genes to Cells* 7, 835–850.

Andrews, N.C., and Faller, D.V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 19, 2499.

Arai, S., and Miyazaki, T. (2005). Impaired maturation of myeloid progenitors in mice lacking novel Polycomb group protein MBT-1. *The EMBO Journal* 24, 1863–1873.

Bailey, T.L., and Machanick, P. (2012). Inferring direct DNA binding from ChIP-seq. *Nucleic Acids Research* 40, e128.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of Molecular Biology* 280, 275–286.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science (New York, N.Y.)* 301, 1090–1093.

Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., and Lima, C.D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, 345–356.

Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J.M., and Nimer, S.D. (2003). The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *The Journal of Biological Chemistry* 278, 15412–15420.

Bonasio, R., Lecona, E., and Reinberg, D. (2010). MBT domain proteins in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 221–230.

Bornemann, D., Miller, E., and Simon, J. (1996). The Drosophila Polycomb group gene Sex comb on midleg (Scm) encodes a zinc finger protein with similarity to polyhomeotic protein. *Development (Cambridge, England)* 122, 1621–1630.

Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 195, 27–38.

- Bruderer, R.,** Tatham, M.H., Plechanovova, A., Matic, I., Garg, A.K., and Hay, R.T. (2011). Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Reports* *12*, 142–148.
- Cartwright, P.,** Müller, H., Wagener, C., Holm, K., and Helin, K. (1998). E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* *17*, 611–623.
- Chandrasekharan, M.B.,** Huang, F., and Sun, Z.-W. (2009). Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 16686–16691.
- David, G.,** Neptune, M.A., and DePinho, R.A. (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *The Journal of Biological Chemistry* *277*, 23658–23663.
- Desterro, J.M.,** Rodriguez, M.S., Kemp, G.D., and Hay, R.T. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *The Journal of Biological Chemistry* *274*, 10618–10624.
- Desterro, J.M.,** Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 Modification of I κ B α Inhibits NF- κ B Activation. *Molecular Cell* *2*, 233–239.
- Desterro, J.M.,** Thomson, J., and Hay, R.T. (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Letters* *417*, 297–300.
- Faesen, A.C.,** Dirac, A.M.G., Shanmugham, A., Ovaa, H., Perrakis, A., and Sixma, T.K. (2011). Mechanism of USP7/HAUSP activation by its C-terminal ubiquitin-like domain and allosteric regulation by GMP-synthetase. *Molecular Cell* *44*, 147–159.
- Feng, Q.,** and Zhang, Y. (2001). The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes & Development* *15*, 827–832.
- Formosa, T.,** Ruone, S., Adams, M., Olsen, A.E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A.R., Kaufman, P.D., and Stillman, D.J. (2002). Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics* *3*, 1557–1571.
- Francis, N.,** and Kingston, R. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2*, 409–421.
- Francis, N.J.,** Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science (New York, N.Y.)* *306*, 1574–1577.
- Galisson, F.,** Mahrouche, L., Courcelles, M., Bonneil, E., Meloche, S., Chelbi-Alix, M.K., and Thibault, P. (2011). A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Molecular & Cellular Proteomics* *10*, M110.004796.

- Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012).** PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Molecular Cell* *45*, 344–356.
- Gateff, E., Löffler, T., and Wismar, J. (1993).** A temperature-sensitive brain tumor suppressor mutation of *Drosophila melanogaster*: development studies and molecular localization of the gene. *Mechanisms of Development* *41*, 15–31.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007).** Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *8*, 947–956.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., and Kubicek, M.T. (1952).** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* *12*, 264–265.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., and Hay, R.T. (2003).** P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular Cell* *11*, 1043–1054.
- Gocke, C.B., Yu, H., and Kang, J. (2005).** Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *The Journal of Biological Chemistry* *280*, 5004–5012.
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M.H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G.J., Mann, M., and Hay, R.T. (2009).** System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science Signaling* *2*, ra24.
- Gong, L., Li, B., Millas, S., and Yeh, E.T. (1999).** Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Letters* *448*, 185–189.
- Gorin, G., Martic, P., and Doughty, G. (1966).** Kinetics of the Reaction of N-Ethylmaleimide with Cysteine and Some Congeners. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *115*, 593–597.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology* *36*, 59–74.
- Grimm, C., De Ayala Alonso, A.G., Rybin, V., Steuerwald, U., Ly-Hartig, N., Fischle, W., Müller, J., and Müller, C.W. (2007).** Structural and functional analyses of methyl-lysine binding by the malignant brain tumour repeat protein Sex comb on midleg. *EMBO Reports* *8*, 1031–1037.
- Grimm, C., Matos, R., Ly-Hartig, N., Steuerwald, U., Lindner, D., Rybin, V., Müller, J., and Müller, C.W. (2009).** Molecular recognition of histone lysine methylation by the Polycomb group repressor dSfmbt. *The EMBO Journal* *28*, 1965–1977.

Guenther, M., Levine, S., Boyer, L., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* *130*, 77–88.

Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R.H., Muir, A. et al. (2004). A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature Genetics* *36*, 837–841.

Guo, Y., Nady, N., Qi, C., Allali-Hassani, A., Zhu, H., Pan, P., Adams-Cioaba, M.A., Amaya, M.F., Dong, A., Vedadi, M. et al. (2009). Methylation-state-specific recognition of histones by the MBT repeat protein L3MBTL2. *Nucleic Acids Research* *37*, 2204–2210.

Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J.A., Bailey, T.L., and Noble, W.S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology* *8*, R24.

Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Molecular Cell* *18*, 1–12.

Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 45–50.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* *37*, 1–13.

Huang, X., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2001). Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry* *70*, 149–180.

Hurlin, P.J., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Eisenman, R.N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *The EMBO Journal* *18*, 7019–7028.

Ivanov, A. V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K.L., Negorev, D.G., Schultz, D.C., Psulkowski, E., Fredericks, W.J., White, D.E., Maul, G.G. et al. (2007). PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Molecular Cell* *28*, 823–837.

Johnson, E., and Blobel, G. (1997). Ubc9p Is the Conjugating Enzyme for the Ubiquitin-like Protein Smt3p. *Journal of Biological Chemistry* 26799–26802.

Johnson, E.S., and Gupta, A.A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* *106*, 735–744.

Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J., and Blobel, G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *The EMBO Journal* *16*, 5509–5519.

- Kahyo**, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Molecular Cell* 8, 713–718.
- Kalakonda**, N., Fischle, W., Boccuni, P., Gurvich, N., Hoya-Arias, R., Zhao, X., Miyata, Y., Macgrogan, D., Zhang, J., Sims, J.K. et al. (2008). Histone H4 lysine 20 monomethylation promotes transcriptional repression by L3MBTL1. *Oncogene* 27, 4293–4304.
- Kerscher**, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Reports* 8, 550–555.
- Kettlun**, A., Uribe, L., Calvo, V., Silva, S., Rivera, J., Mancilla, M., Antonieta, M., Valenzuela, and Traverso-Cori, A. (1982). Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 21, 551–558.
- Kim**, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., and Bedford, M.T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Reports* 7, 397–403.
- Klymenko**, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Müller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes & Development* 20, 1110–1122.
- Van der Knaap**, J.A., Kozhevnikova, E., Langenberg, K., Moshkin, Y.M., and Verrijzer, C.P. (2010). Biosynthetic enzyme GMP synthetase cooperates with ubiquitin-specific protease 7 in transcriptional regulation of ecdysteroid target genes. *Molecular and Cellular Biology* 30, 736–744.
- Van der Knaap**, J.A., Kumar, B.R.P., Moshkin, Y.M., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck, A.J.R., Karch, F., and Verrijzer, C.P. (2005). GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Molecular Cell* 17, 695–707.
- Koga**, H., Matsui, S., Hirota, T., Takebayashi, S., Okumura, K., and Saya, H. (1999). A human homolog of *Drosophila* lethal(3)malignant brain tumor (l(3)mbt) protein associates with condensed mitotic chromosomes. *Oncogene* 18, 3799–3809.
- Kouskouti**, A., and Talianidis, I. (2005). Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *The EMBO Journal* 24, 347–357.
- Kouzarides**, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Krogan**, N., Kim, M., Ahn, S., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J.F. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Molecular and Cellular Biology* 22, 6979–6992.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10, R25.

Lechtenberg, B.C., Allen, M.D., Rutherford, T.J., Freund, S.M. V, and Bycroft, M. (2009). Solution structure of the FCS zinc finger domain of the human polycomb group protein L(3)mbt-like 2. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* 18, 657–661.

Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147–151.

Lewis, P., Beall, E., Fleischer, T.C., Georlette, D., Link, A.J., and Botchan, R. (2004). Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes & Development* 18, 2929–2940.

Li, H., Fischle, W., Wang, W., Duncan, E.M., Liang, L., Murakami-Ishibe, S., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. *Molecular Cell* 28, 677–691.

Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., and Gu, W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Molecular Cell* 13, 879–886.

Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648–653.

Li, S.J., and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246–251.

Lin, D., Tatham, M.H., Yu, B., Kim, S., Hay, R.T., and Chen, Y. (2002). Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 21740–21748.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 402–408.

Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., and Hirano, T. (2000). Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *The Journal of Cell Biology* 150, 405–416.

MacGrogan, D., Kalakonda, N., Alvarez, S., Scandura, J.M., Boccuni, P., Johansson, B., and Nimer, S.D. (2004). Structural integrity and expression of the L3MBTL gene in normal and malignant hematopoietic cells. *Genes, Chromosomes & Cancer* 41, 203–213.

Machanick, P., and Bailey, T.L. (2011). MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)* 27, 1696–1697.

- Mahajan**, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97–107.
- Mason**, P., and Struhl, K. (2003). The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 23, 8323–8333.
- Matic**, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., Van Santen, M.A., Van de Rijke, F., Van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Molecular Cell* 39, 641–652.
- Matunis**, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* 135, 1457–1470.
- Maurer-Stroh**, S., Dickens, N.J., Hughes-davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C.P. (2003). The Tudor domain “Royal Family”: Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. 28, 69–74.
- Melchior**, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 591–626.
- Min**, J., Allali-Hassani, A., Nady, N., Qi, C., Ouyang, H., Liu, Y., MacKenzie, F., Vedadi, M., and Arrowsmith, C.H. (2007). L3MBTL1 recognition of mono- and dimethylated histones. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1229–1230.
- Minty**, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 36316–36323.
- Murawsky**, C.M., Brehm, A., Badenhorst, P., Lowe, N., Becker, P.B., and Travers, A.A. (2001). Tramtrack69 interacts with the dMi-2 subunit of the Drosophila NuRD chromatin remodelling complex. *EMBO Reports* 2, 1089–1094.
- Newburger**, D.E., and Bulyk, M.L. (2009). UniPROBE: an online database of protein binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Research* 37, D77–82.
- Northcott**, P.A., Nakahara, Y., Wu, X., Feuk, L., Ellison, D.W., Croul, S., Mack, S., Kongkham, P.N., Peacock, J., Dubuc, A. et al. (2009). Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nature Genetics* 41, 465–472.
- Ogawa**, H., Ishiguro, K.-I., Gaubatz, S., Livingston, D.M., and Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science (New York, N.Y.)* 296, 1132–1136.

- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998).** FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105–116.
- Orphanides, G., Wu, W.-H., Lane, W., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999).** The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284–288.
- Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T.H., Gabbay, K.H., and Bohren, K.M. (2005).** A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 517–520.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006).** Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703–717.
- Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoege, C., and Jentsch, S. (2005).** SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428–433.
- Psakhye, I., and Jentsch, S. (2012).** Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* 151, 807–820.
- Qin, J., Buren, D. Van, Huang, H., Zhong, L., Mostoslavsky, R., Akbarian, S., and Hock, H. (2010).** Chromatin protein L3mbtl1 is dispensable for development and tumor suppression in mice. *Journal of Biological Chemistry* 36, 27767–27775.
- Qin, J., Whyte, W.A., Anderssen, E., Apostolou, E., Chen, H.-H., Akbarian, S., Bronson, R.T., Hochedlinger, K., Ramaswamy, S., Young, R.A. et al. (2012).** The Polycomb Group Protein L3mbtl2 Assembles an Atypical PRC1-Family Complex that Is Essential in Pluripotent Stem Cells and Early Development. *Cell Stem Cell* 2, 1–14.
- Rischitor, G. (2005).** Transcription Factor Sp3 as a target for SUMOylation *in vitro*. Dissertation, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Ringrose, L., and Paro, R. (2004).** Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annual Review of Genetics* 38, 413–443.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T. (2001).** SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 12654–12659.
- Roseman, R.R., Morgan, K., Mallin, D.R., Roberson, R., Parnell, T.J., Bornemann, D.J., Simon, J.A., and Geyer, P.K. (2001).** Long-range repression by multiple polycomb group (PcG) proteins targeted by fusion to a defined DNA-binding domain in *Drosophila*. *Genetics* 158, 291–307.
- Rozenblatt-Rosen, O., Hughes, C., Nannepaga, S., Shanmugam, K.S., Copeland, T.D., Guszczynski, T., Resau, J.H., and Meyerson, M. (2005).** The Parafibromin

Tumor Suppressor Protein Is Part of a Human Paf1 Complex. *Molecular and Cellular Biology* 25, 612–620.

Saether, T., Berge, T., Ledsaak, M., Matre, V., Alm-Kristiansen, A.H., Dahle, O., Aubry, F., and Gabrielsen, O.S. (2007). The chromatin remodeling factor Mi-2alpha acts as a novel co-activator for human c-Myb. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 13994–14005.

Sampath, S.C., Marazzi, I., Yap, K.L., Sampath, S.C., Krutchinsky, A.N., Mecklenbräuker, I., Viale, A., Rudensky, E., Zhou, M.-M., Chait, B.T. et al. (2007). Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Molecular Cell* 27, 596–608.

Sampson, D.A., Wang, M., and Matunis, M.J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 21664–21669.

Sapetschnig, A. (2006). Mechanismen der SUMO-vermittelten Repression am Beispiel des Transkriptionsfaktors Sp3: Identifizierung potentieller Korepressoren. Dissertation, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.

Sapetschnig, A., Koch, F., Rischitor, G., Mennenga, T., and Suske, G. (2004). Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 42095–42105.

Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *The EMBO Journal* 21, 5206–5215.

Sarkari, F., Sanchez-Alcaraz, T., Wang, S., Holowaty, M.N., Sheng, Y., and Frappier, L. (2009). EBNA1-mediated recruitment of a histone H2B deubiquitylating complex to the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *PLoS Pathogens* 5, e1000624.

Sathyamurthy, A., Allen, M.D., Murzin, A.G., and Bycroft, M. (2003). Crystal structure of the malignant brain tumor (MBT) repeats in Sex Comb on Midleg-like 2 (SCML2). *The Journal of Biological Chemistry* 278, 46968–46973.

Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E.D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J.T. (2003). Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science (New York, N.Y.)* 301, 1094–1096.

Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kingston, R.E. (2001). A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655–660.

Schaefer, C.F., Anthony, K., Krupa, S., Buchoff, J., Day, M., Hannay, T., and Buetow, K.H. (2009). PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Research* 37, D674–9.

- Schotta**, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development* *18*, 1251–1262.
- Schultz**, D., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G., and Rauscher, F. (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & Development* *16*, 919–932.
- Song**, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14373–14378.
- Stielow**, B., Sapetschnig, A., Krüger, I., Kunert, N., Brehm, A., Boutros, M., and Suske, G. (2008a). Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Molecular Cell* *29*, 742–754.
- Stielow**, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Krüger, I., and Suske, G. (2008b). SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Reports* *9*, 899–906.
- Subramanian**, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 15545–15550.
- Sumara**, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., and Peters, J.M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *The Journal of Cell Biology* *151*, 749–762.
- Suske**, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* *238*, 291–300.
- Tachibana**, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., and Shinkai, Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *The Journal of Biological Chemistry* *276*, 25309–25317.
- Tatham**, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry* *276*, 35368–35374.
- Tatham**, M.H., Rodriguez, M.S., Xirodimas, D.P., and Hay, R.T. (2009). Detection of protein SUMOylation in vivo. *Nature Protocols* *4*, 1363–1371.

Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1025–1040.

Tong, J., Hassig, C., Schnitzler, G., Kingston, R.E., and Schreiber, S.L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395, 917–921.

Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N., and Lees, J.A. (1998). E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2850–2855.

Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et al. (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Molecular Cell* 42, 438–450.

Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D. et al. (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129, 915–928.

De la Vega, L., Fröbisch, K., Moreno, R., Calzado, M.A., Geng, H., and Schmitz, M.L. (2011). Control of nuclear HIPK2 localization and function by a SUMO interaction motif. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813, 283–297.

Vertegaal, A.C.O., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M., and Lamond, A.I. (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 2298–2310.

Vlieghe, D., Sandelin, A., De Bleser, P.J., Vleminckx, K., Wasserman, W.W., Van Roy, F., and Lenhard, B. (2006). A new generation of JASPAR, the open-access repository for transcription factor binding site profiles. *Nucleic Acids Research* 34, D95–7.

Vollmer, M. (2005). Der Transkriptionsfaktor Sp3: Etablierung eines zellulären Systems zur Analyse der SUMO-abhängigen Inaktivierung von Sp3, Untersuchungen zur Erythropoiese in Sp1/Sp3-doppelheterozygoten Mäusen. Diplomarbeit, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.

Wang, W.K., Tereshko, V., Boccuni, P., MacGrogan, D., Nimer, S.D., and Patel, D.J. (2003). Malignant Brain Tumor Repeats: A Three-Leaved Propeller Architecture with Ligand/Peptide Binding Pockets. *Structure* 11, 775–789.

West, L.E., Roy, S., Lachmi-Weiner, K., Hayashi, R., Shi, X., Appella, E., Kutateladze, T.G., and Gozani, O. (2010). The MBT repeats of L3MBTL1 link SET8-mediated p53 methylation at lysine 382 to target gene repression. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 37725–37732.

- Westman**, B.J., Verheggen, C., Hutten, S., Lam, Y.W., Bertrand, E., and Lamond, A.I. (2010). A proteomic screen for nucleolar SUMO targets shows SUMOylation modulates the function of Nop5/Nop58. *Molecular Cell* 39, 618–631.
- Van de Wetering**, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M.T., Brantjes, H., Van Leenen, D., Holstege, F.C.P., Brummelkamp, T.R., Agami, R., and Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Reports* 4, 609–615.
- Wismar**, J., Löffler, T., Habtemichael, N., Vef, O., Geißen, M., Zirwes, R., Altmeyer, W., Sass, H., and Gateff, E. (1995). The *Drosophila melanogaster* tumor suppressor gene lethal(3)malignant brain tumor encodes a proline-rich protein with a novel zinc finger. *Mechanisms of Development* 53, 141–154.
- Yang**, M., Hsu, C.-T., Ting, C.-Y., Liu, L.F., and Hwang, J. (2006a). Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 8264–8274.
- Yang**, S.-H., Galanis, A., Witty, J., and Sharrocks, A.D. (2006b). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO Journal* 25, 5083–5093.
- Yeap**, L.-S., Hayashi, K., and Surani, M.A. (2009). ERG-associated protein with SET domain (ESET)-Oct4 interaction regulates pluripotency and represses the trophectoderm lineage. *Epigenetics & Chromatin* 2, 12.
- Yoo**, J.-Y., Choi, K.-C., Kang, H., Kim, Y.J., Lee, J., Jun, W.J., Kim, M.-J., Lee, Y.-H., Lee, O.-H., and Yoon, H.-G. (2010). Histone deacetylase 3 is selectively involved in L3MBTL2-mediated transcriptional repression. *FEBS Letters* 584, 2225–2230.
- Zhang**, H., Christoforou, A., Aravind, L., Emmons, S.W., Van den Heuvel, S., and Haber, D.A. (2004). The *C. elegans* Polycomb gene SOP-2 encodes an RNA binding protein. *Molecular Cell* 14, 841–847.
- Zhang**, X.-D., Goeres, J., Zhang, H., Yen, T.J., Porter, A.C.G., and Matunis, M.J. (2008a). SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Molecular Cell* 29, 729–741.
- Zhang**, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoutte, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W. et al. (2008b). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology* 9, R137.
- Zheng**, G., and Yang, Y.-C. (2004). ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 42410–42421.
- Zhu**, B., Mandal, S., Pham, A., Zheng, Y., Erdjument-Bromage, H., Batra, S.K., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005a). The human PAF complex coordinates transcription with events downstream of RNA synthesis. *Genes & Development* 19, 1668–1673.

Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.-D., Mandal, S.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005b). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular Cell* 20, 601–611.

7. Anhang

Daten-CD

Tabelle A1: Native L3MBTL2 Peaks (FDR <0,001)

Aufgelistet sind die 8009 endogenen L3MBTL2 Peaks einer FDR <0,001. Die Tag Counts der Proben HEK_antiL2 und L2wt-IgG stammen aus jeweils zwei fusionierten ChIP-Sequenzierungen. Die mittels ChIP-Experimenten validierten Zielgene wurden hervorgehoben.

Tabelle A2: Union Peaks von L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R (FDR <0,001)

Aufgelistet sind die 16569 unabhängigen (unique) Peaks für L3MBTL2, 3xFLAG-L3MBTL2 und 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R nach Fusion aller Peaks einer FDR <0,001. Die Tag Counts der Proben HEK_antiL2 und L2wt-IgG stammen aus jeweils zwei fusionierten ChIP-Sequenzierungen.

Tabelle A3: Gene mit L3MBTL2 Peaks (FDR <0,001) +/- 1250 Bp relativ zum TSS

Aufgelistet sind die 7764 Gene mit einem Peak von endogenem L3MBTL2 (FDR <0,001) +/- 1250 Bp relativ zum Transkriptionsstart. Die Spalten G bis J zeigen die Ergebnisse der Microarray-Analysen für die entsprechenden Gene nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gegenüber HEK-Zellen. m: nicht im Microarray identifiziert; n: nicht dereguliert; u: induziert; d: reprimiert. Die mittels ChIP-Experimenten validierten Zielgene wurden hervorgehoben.

Tabelle A4: Funktionale Annotation der Zielgene von endogenem L3MBTL2 (FDR <0,001)

Aufgelistet ist die funktionale Annotation der 7764 durch endogenes L3MBTL2 im Bereich von +/- 1250 Bp gebundenen Gene einer FDR <0,001.

Tabelle A5: Liste der $\geq 1,5$ -fach deregulierten Sonden nach Überexpression von 3xF-L2WT vs. mock

Aufgelistet sind alle 413 Sonden mit einer mindestens 1,5-fachen Deregulation nach der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 gegenüber HEK-Zellen, einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die 413 deregulierten Sonden wurden 385 deregulierten Genen zugeordnet. Der Microarray erfolgte mit zwei unabhängigen Kontroll-RNAs (mock_1,2) sowie drei unabhängigen RNA-Präparation nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 (3xF-L2WT_1,2,3).

Tabelle A6: Liste der $\geq 1,5$ -fach induzierten, direkten Zielgene nach Überexpression von 3xF-L2WT vs. mock

Aufgelistet sind die 55 direkt durch L3MBTL2 gebundenen Zielgene mit einer mindestens 1,5-fachen Aktivierung nach der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 gegenüber HEK-Zellen, einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die Spalte J zeigt das entsprechende Ergebnis der Microarray-Analysen nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gegenüber HEK-Zellen. m: nicht im Microarray identifiziert; n: nicht dereguliert; u: induziert; d: reprimiert.

Tabelle A7: Liste der $\geq 1,5$ -fach reprimierten, direkten Zielgene nach Überexpression von 3xF-L2WT vs. mock

Aufgelistet sind die 34 direkt durch L3MBTL2 gebundenen Zielgene mit einer mindestens 1,5-fachen Repression nach der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 gegenüber HEK-Zellen, einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die Spalte J zeigt das entsprechende Ergebnis der Microarray-Analysen nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gegenüber HEK-Zellen. m: nicht im Microarray identifiziert; n: nicht dereguliert; u: induziert; d: reprimiert.

Tabelle A8: Liste der $\geq 1,5$ -fach deregulierten Sonden nach Überexpression von 3xF-L2KR vs. mock

Aufgelistet sind alle 519 Sonden mit einer mindestens 1,5-fachen Deregulation nach der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gegenüber HEK-Zellen, einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die 519 deregulierten Sonden wurden 461 deregulierten Genen zugeordnet. Der Microarray erfolgte mit zwei unabhängigen Kontroll-RNAs (mock_1,2) sowie drei unabhängigen RNA-Präparation nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R (3xF-L2KR_1,2,3). Die mittels RT-qPCR Analysen validierten, durch SUMOyliertes L3MBTL2 reprimierten Zielgene *LOX*, *CXCL2*, *ESRP2* und *JAM2* wurden hervorgehoben.

Tabelle A9: Liste der $\geq 1,5$ -fach induzierten, direkten Zielgene nach Überexpression von 3xF-L2KR vs. mock

Aufgelistet sind die 64 direkt durch L3MBTL2 gebundenen Zielgene mit einer mindestens 1,5-fachen Aktivierung nach der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gegenüber HEK-Zellen, einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die Spalte J zeigt das entsprechende Ergebnis der Microarray-Analysen nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 gegenüber HEK-Zellen. m: nicht im Microarray identifiziert; n: nicht dereguliert; u: induziert; d: reprimiert. Das mittels RT-qPCR Analysen validierte, durch SUMOyliertes L3MBTL2 reprimierte Zielgen *LOX* wurde hervorgehoben.

Tabelle A10: Liste der $\geq 1,5$ -fach reprimierten, direkten Zielgene nach Überexpression von 3xFLN2KR vs. mock

Aufgelistet sind die 30 direkt durch L3MBTL2 gebundenen Zielgene mit einer mindestens 1,5-fachen Repression nach der Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R gegenüber HEK-Zellen, einer durchschnittlichen log Fluoreszenzintensität von 5 und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die Spalte J zeigt das entsprechende Ergebnis der Microarray-Analysen nach Überexpression von 3xFLAG-L3MBTL2 gegenüber HEK-Zellen. m: nicht im Microarray identifiziert; n: nicht dereguliert; u: induziert; d: reprimiert.

Tabelle A11: Liste der mittels Massenspektrometrie identifizierten potentiellen Interaktionspartner von L3MBTL2

Aufgelistet sind die 554 nach Aufreinigung von 3xFLAG-L3MBTL2- bzw. 3xFLAG-L3MBTL2K675,700R-enthaltenden Proteinkomplexen identifizierten potentiellen Interaktionspartner von L3MBTL2. Zusätzlich angegeben ist der Status der SUMOylierung jedes Proteins. Die entsprechenden Referenzen finden sich in Spalte W.

Abkürzungsverzeichnis

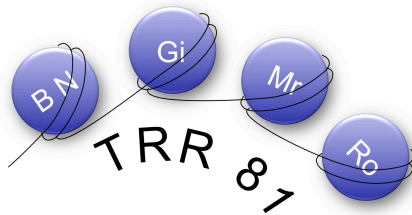
α	anti
A	Adenosin
AMP	Adenosinmonophosphat
AOS1	Activation of Smt3p
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
$C_2H_3KO_2$	Kaliumacetat
$C_4H_6MgO_4$	Magnesiumacetat
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
$CH_5N_3 \times HCl$	Guanidinhydrochlorid
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin Immunpräzipitation-Sequenzierung
CMV	Cytomegalie-Virus
Ct	Cycle Threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dPc	<i>Drosophila</i> Polycomb
dPho	<i>Drosophila</i> Pleiohomeotic
dREAM	<i>Drosophila</i> RBF, dE2F2, and dMyb-interacting proteins
dScm	<i>Drosophila</i> Sex comb on midleg
dSfmbt	<i>Drosophila</i> Scm-related gene containing four mbt domains
DTT	1,4-Dithiothreitol

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbistetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EuHMTase1	Euchromatische Histon-Lysin N-Methyltransferase 1
FACT	Facilitates Chromatin Transcription
FDR	False Discovery Rate
F-Luc	Firefly-Luziferase (-luciferase)
G	Guanosin
G9a	Euchromatische Histon-Lysin N-Methyltransferase 2
GFP	Green fluorescent protein
GMPS	Guanosin-5'-monophosphat Synthetase
H2A,2B,3,4	Histon H2A, H2B, H3, H4
HA	Hämagglutinin
HDAC	Histondeacetylase
HEK	Human Embryonic Kidney Zelllinie
HeLa	Henrietta Lacks Zelllinie
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinethanasulfonsäure
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HRP	Horseradish Peroxidase
ID	Inhibitorische Domäne von Sp3
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
K	Lysin
KAP1	KRAB-associated Protein 1
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Lurie-Bertani
dL(3)mbt	<i>Drosophila</i> Lethal(3)malignant brain tumor
L3MBTL	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry
lincRNA	long intergenic noncoding RNA

MAX	Myc assoziierter Faktor X
MBT	Malignant Brain Tumor
MDa	Megadalton
MDM2	Mouse double minute 2 Homolog
me	methyl/methyliert
MEF	Embryonale Mausfibroblasten (Mouse Embryonic Fibroblasts)
MGA	MAX Gen assoziiertes Protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mi-2	Mitchell Autoimmun-Antikörper 2
min	Minute
M _r	Molekulargewicht
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
Na ₂ S ₂ O ₅	Natriumdisulfit
NEM	N-Ethylmaleinimide
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NP-40	Nonidet P-40
NuRD	Nucleosome Remodelling and Deacetylase
PAA	Polyacrylamid
PAF	RNA Polymerase II assoziierter Faktor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCGF6	Polycomb-Gruppen RING-Finger Protein 6
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PhoRC	Pho repressive complex
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRC1/2	Polycomb repressive complex 1/2
dPsc	<i>Drosophila</i> Posterior sex combs
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qPCR	quantitative PCR
R	Arginin
RanGAP1	Ran-GTPase-activating protein 1
RING1,2	RING-Finger Protein 1,2
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNF20,40	RING-Finger Protein 20, 40
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
RYBP	RING1 und YY1 bindendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SENP	Sentrin/SUMO-spezifische Protease
shRNA	short hairpin RNA
SIM	SUMO-Interaktionsmotiv
siRNA	small interfering RNA
Sp	Specificity Protein
SSRP1	Structure-specific recognition protein 1
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SUPT16H	Suppressor of Ty 16 homolog
SV40	Simian-Virus 40
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
UBA2	Ubiquitin-activating enzyme
UBC9	Ubiquitin-conjugating enzyme
UpM	Umdrehungen pro Minute
USP7	Ubiquitin-spezifische Protease 7
v/v	Volumen pro Volumen

WDR5	WD repeat-enthaltendes Protein 5
WT	wildtypisch, Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YAF2	YY1 assoziierter Faktor 2



PhD Portfolio - MGK

Zusammenfassung der PhD Ausbildung

Name der PhD Studentin: Christina Stielow

Zugehörigkeit:

Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT)
Philipps-Universität Marburg
Emil-Mannkopff-Str. 2
D-35032 Marburg
Tel: 06421-28-65420
Fax: 06421-28-65959
E-mail: c.stielow@imt.uni-marburg.de

Beginn der Promotion: 01.06.2007

Thema der Dissertation:

Funktionale Analysen zur SUMOylierung des transkriptionellen Repressors
L3MBTL2

Promotionskomitee:

1. Prof. Dr. Guntram Suske (Leiter)
2. Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
3. Prof. Dr. Alexander Brehm

Treffen des Promotionskomitees:

28.11.07
23.-28.02.08
20.06.08
21.-26.02.09
20.03.09
27.11.09
20.-25.02.10
03.02.11
19.-24.02.11
07.02.13

Teilnahme an Tagungen und Konferenzen

23.-28.02.08	6 th Winter School of the International GRK 767 <i>Transcriptional Control in Developmental Processes</i> Kleinwalsertal, Österreich
27.-29.03.08	59. Mosbacher Kolloquium <i>Epigenetics - Molecular Principles and Mechanisms</i> Mosbach, Deutschland
21.-26.02.09	7 th Winter School of the International GRK 767 <i>Transcriptional Control in Developmental Processes</i> Kleinwalsertal, Österreich Vortrag: <i>Mechanisms of corepressor recruitment by SUMOylated Sp3</i>
20.-25.02.10	8 th Winter School of the International GRK 767 <i>Transcriptional Control in Developmental Processes</i> Kleinwalsertal, Österreich Vortrag: <i>SUMOylation of chromatin-associated repression components</i>
19.-24.02.11	1 st Retreat of the TRR81 <i>Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies</i> Kleinwalsertal, Österreich Vortrag: <i>SUMOylation of the histone binding protein L3MBTL2</i>
12.-14.09.11	TRR81 Symposium on <i>Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies</i> Gießen, Deutschland
26.-27.06.12	Abcam conference on <i>Chromatin: from structure to epigenetics</i> Strasbourg, Frankreich

Organisation von Workshops/Minisymposien

- 12.12.11 2nd TRR81 PhD Minisymposium
SUMO meets chromatin
Marburg, Deutschland
- 12.03.13 Chromatin Methods Club der IRTG *Epigenetics and Chromatin*
Vortrag: *Peptide pulldown assays*
Marburg, Deutschland

Workshops

- 11.-15.02.08 Scientific Presentation (Bioscript, Dr. R. Willmott)
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg
- 30.09.-01.10.08 Workshop zur Lichtmikroskopie (Leica, Prof. R. Jakob)
Institut für Zellbiologie, Marburg
- 20.-22.01.10 Scientific Writing (Bioscript, Dr. R. Willmott)
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg

Literaturseminare (IMT, Marburg)

- 13.11.07 Vortrag: *E2F Activation of S Phase Promoters via Association with HCF-1 and the MLL Family of Histone H3K4 Methyltransferases*
- 09.07.08 Vortrag: *Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2*
- 16.12.08 Vortrag: *Histone H3K36 methylation is mediated by a trans-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4*

- 30.05.09 Vortrag: *Direct Binding of CoREST1 to SUMO-2/3 Contributes to Gene-Specific Repression by the LSD1/CoREST1/HDAC Complex*
- 02.02.10 Vortrag: *Epigenetic gene silencing by the SRY protein is mediated by a KRAB-O protein that recruits the KAP1 co-repressor machinery*
- 13.07.10 Vortrag: *PELP1 is a reader of histone H3 methylation that facilitates oestrogen receptor-alpha target gene activation by regulating lysine demethylase 1 specificity*
- 23.11.10 Vortrag: *Human LSD2/KDM1b/AOF1 Regulates Gene Transcription by Modulating Intragenic H3K4me2 Methylation*
- 31.05.11 Vortrag: *L3MBTL2 Protein Acts in Concert with PcG Protein-Mediated Monoubiquitination of H2A to Establish a Repressive Chromatin Structure*
- 06.03.12 Vortrag: *PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes*

Veröffentlichungen

Stielow, B., Sapetschnig, A., **Wink, C.**, Krüger, I., and Suske, G. 2008. SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* **9**(9): 899-906.

Kongressbeiträge

B. Stielow, A. Sapetschnig, **C. Wink** and G. Suske: *SUMO-modified transcription factors repress transcription by provoking local heterochromatic gene silencing*. 4th International Conference Ubiquitin, Ubiquitin-like Proteins and Cancer, 07.-09.02.08, Houston, USA.

B. Stielow, A. Sapetschnig, **C. Wink** and G. Suske: *SUMO-modified transcription factors repress transcription by provoking local heterochromatic gene silencing*. 59. Mosbacher Kolloquium Epigenetics – Molecular Principles and Mechanisms, 27.-29.03.08, Mosbach.

Marburg, den 21.03.2013

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Kaiserslautern waren die Damen und Herren:

Anke, Arendholz, Brüne, Büdel, Cullum, Deitmer, Friauf, Gesmann-Nuissl, Güttinger, Hahn, Hakenbeck, Henrich, Krüger, Leitz, Neuhaus, Philipp, Redenbach, Scherthan, Sültemeyer, Trommer, Türk, Wirth, Zankl, Ziegler

Danksagung

In fast sechs Jahren kommt eine lange Liste von Personen zusammen, von denen jeder auf seine ganz persönliche Weise zu dieser Arbeit beigetragen hat. Danke an euch alle! Bei einigen von euch möchte ich mich hier aber noch ganz besonders bedanken.

Als erstes gilt mein Dank natürlich Guntram, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Gruppe zu arbeiten. Ich habe in der ganzen Zeit viel gelernt und mich sehr gut betreut gefühlt. Dir ist das vielleicht nicht bewusst, aber wir wissen alle sehr zu schätzen, dass du dir immer Zeit nimmst und uns gegenüber immer offen bist.

Ohne ein funktionierendes Labor ist ein produktives Arbeiten natürlich auch nicht möglich. Deswegen möchte ich mich bei der wichtigsten Person in unserem Labor ganz besonders bedanken. Liebe Frau Rohner, weltbester Franck oder große Schwester im Geiste, ohne dich wären manche Zeiten noch viel schwieriger, mancher Frust noch viel größer und viele schöne Momente weniger schön gewesen. Ich bin dir sehr dankbar, dass du immer da warst, bist und bleibst!

Since two years another for me very important person in the lab was our little Miss Sunshine. Gloritis, thank you so much for giving energy, spreading optimism and simply for being a friend. Sometimes a „Come on, Christina“ was really helpful!

Einen ganz großen Anteil an dieser Arbeit haben auch zwei der wichtigsten Menschen in meinem Leben. Liebe Mama und lieber Papa, von ganzem Herzen danke dafür, dass ihr immer da seid, immer an mich glaubt und mich in allem, was ich mache, unterstützt!

Das Wichtigste kommt bekanntlich immer zum Schluss. Allein wegen dir, war die Entscheidung nach Marburg zu gehen, die beste meines Lebens. Durch dich hat sich einfach alles verändert, du machst mich jeden Tag glücklich und wirst der beste Papa sein, den ich mir vorstellen kann! Danke, dass du so bist, wie du bist!